

**Kolonienstimulierende Aktivität
in Mäuseseren nach Vorbehandlung
mit Inducern aus Pockenviren
und anderen Mikroorganismen**

Georg Wolf

Disbui. München

1987



Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr

Kolonienstimulierende Aktivität in Mäuseseren
nach Vorbehandlung mit Inducern aus
Pockenviren und anderen Mikroorganismen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von

Georg Wolf
aus Edersberg

München 1986

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München**

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. M. Rüsse

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

1. Einführung

2. Einführung

2.1 Allgemeine Grundlagen des Management

2.1.1 Managementkonzepte / Konzepte

2.1.2 Management / Management / Management

2.2 Managementkonzepte des Management / Management

2.2.1 Einführung des Managementkonzepts

2.2.2 Managementkonzepte

2.2.3 Managementkonzepte / Managementkonzepte

2.3 Managementkonzepte des Managementkonzepts / Managementkonzepts

Meinen Eltern und Lehrern in Dankbarkeit

3. Managementkonzepte

3.1 Managementkonzepte

3.1.1 Managementkonzepte

3.1.2 Managementkonzepte des Managementkonzepts / Managementkonzepts

3.1.3 Managementkonzepte des Managementkonzepts / Managementkonzepts

3.1.4 Managementkonzepte

3.1.5 Managementkonzepte

3.1.6 Managementkonzepte

3.2 Managementkonzepte

3.2.1 Managementkonzepte

3.2.2 Managementkonzepte

3.3 Managementkonzepte

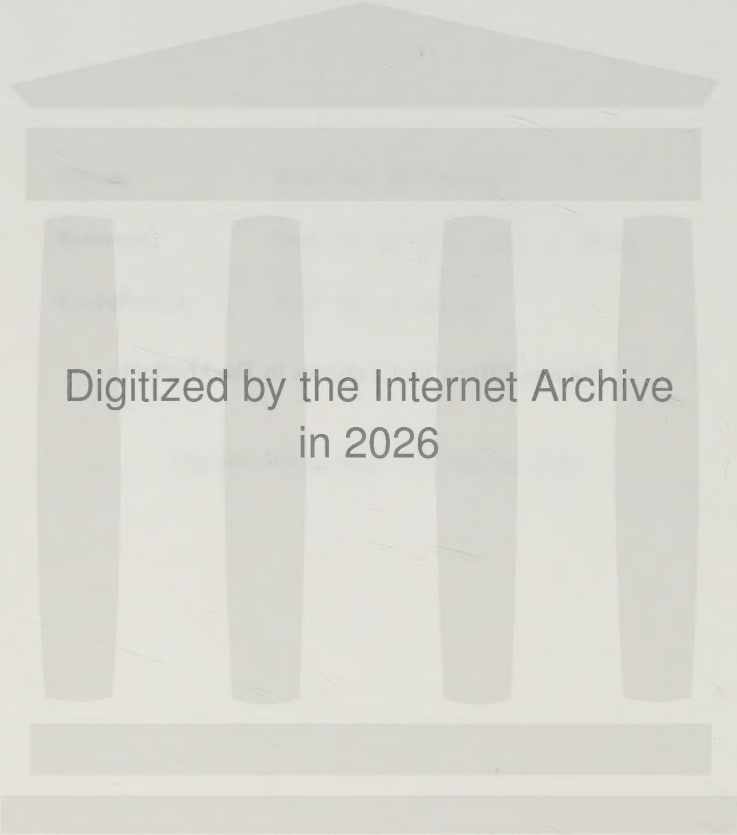
3.3.1 Managementkonzepte / Managementkonzepte / Managementkonzepte

3.3.2 Managementkonzepte / Managementkonzepte / Managementkonzepte

3.3.3 Managementkonzepte / Managementkonzepte / Managementkonzepte

3.3.4 Managementkonzepte / Managementkonzepte / Managementkonzepte

3.3.5 Managementkonzepte / Managementkonzepte / Managementkonzepte



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0101

INHALT

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1 Allgemeine Grundlagen der Hämatopoese	2
2.1.1 Hämatopoetische Stammzelle	2
2.1.2 Determinierte Vorläuferzellen (Progenitoren)	3
2.2 Wachstumsfaktoren des hämatopoetischen Systems	6
2.2.1 Geschichte und Nomenklatur	6
2.2.2 Regeneratives Prinzip	8
2.2.3 Übersicht derzeit bekannter Faktoren	10
2.3 Bedeutung der Wachstumsfaktoren für das körpereigene Abwehrsystem	16
3. Eigene Untersuchungen	
3.1 Material und Methoden	19
3.1.1 Tiermaterial	19
3.1.2 Vorbehandlung der Mäuse und Gewinnung von Seren	20
3.1.3 Herstellung von Zellsuspensionen aus Mäuseorganen	20
3.1.3.1 Knochenmarkzellen	20
3.1.3.2 Milzzellen	21
3.1.4 Permanente Zell-Linie	21
3.1.5 Zellzählung	22
3.1.6 Herstellung konditionierter Medien	22
3.1.6.1 Pokeweed-Mitogen-stimuliertes Milzzellen-konditioniertes Medium (PWM-SCM = Pokeweed Mitogen Spleen Cell Conditioned Medium)	22
3.1.6.2 WEHI-3B-konditioniertes Medium (WEHI-3B CM)	23
3.1.6.3 Konzentrierung konditionierter Medien	23

3.1.7 Substanzen zur in vivo Vorbehandlung	24
3.1.7.1 Kontrollen: Lipopolysaccharid und Negativ-Kontrollen	24
3.1.7.2 Paramunitätsinducer PIND-AVI	24
3.1.7.3 Paramunitätsinducer PIND-ORF	25
3.1.7.4 Orf-Virus Hüllpräparation	26
3.1.7.5 Aujeszky Virus	26
3.1.7.6 <i>Corynebacterium parvum</i> (Propioni- bacterium acnes)	27
3.1.7.7 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Lysat	27
3.1.7.8 <i>Bordetella bronchiseptica</i> Lysat	27
3.1.7.9 <i>Candida albicans</i>	27
3.1.7.10 T-2 Toxin	28
3.1.8 In vitro-Testsystem zum Nachweis von kolonien- stimulierender Aktivität im Serum der Maus	29
3.1.8.1 Kultur hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark im halbflüssigen System	29
3.1.8.2 Testauswertung	30
3.1.8.3 Standardisierung des Testsystems	32
3.1.8.4 Einfluß von fetalem Kälberserum (FCS)	33
3.1.9 In vivo-Test in der Maus zum Nachweis der Wirksam- keit von PIND-ORF auf die relative Anzahl kolonien- bildender Zellen in der Kultur (CFC)	
aus Knochenmarkszellen	35
3.2. Ergebnisse	36
3.2.1 Milzzellen-konditionierte Medien	36
3.2.2 Einfluß von fetalem Kälberserum	39
3.2.3 Kolonienstimulierende Aktivität (CSA) im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Lipopolysaccharid (Positivkontrolle) und Negativ- kontrollen (Placebo)	41
3.2.3.1 Placebos	41
3.2.3.2 Lipopolysaccharid	41

3.2.4	Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Paramunitätsinducern aus Pockenviren	44
3.2.4.1	Kinetik und Dosis-Wirkungsbeziehung beim Einsatz von PIND-ORF	44
3.2.4.2	Kinetik und Dosis-Wirkungsbeziehung beim Einsatz von PIND-AVI	47
3.2.4.3	Kolonienstimulierende Aktivität (CSA) im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit einer gereinigten Virus-Hüllpräparation aus Orf-Virus	52
3.2.5	Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Aujeszky Virus	54
3.2.6	Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Präparationen bakterieller Herkunft	54
3.2.7	Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Präparationen aus Pilzen	57
3.2.7.1	T-2 Toxin	57
3.2.7.2	Candida albicans	57
3.2.8	Änderung der relativen Zahl kolonienbildender Zellen (CFC) im Knochenmark von Mäusen nach Vorbehandlung mit PIND-ORF	60
4.	Besprechung der Ergebnisse	62
5.	Zusammenfassung\ Summary	67
6.	Literaturverzeichnis	69
7.	Abkürzungen	84

1. Einleitung

Die klassische Immunologie befaßt sich mit den spezifischen Leistungen des Immunsystems. Hier stehen lösliche Antikörper und antigen-spezifizierte zellgebundene Reaktionen (cytotoxische T-Zellen) im Mittelpunkt.

Daneben aber sind für den Schutz gegen unterschiedliche Noxen eine Reihe nicht antigenspezifizierter Abwehrmechanismen notwendig. Dieser Bereich des Immunsystems wird als paraspezifisch bezeichnet (im Gegensatz zum spezifischen Anteil). Dabei lassen sich direkt gegen Noxen gerichtete zelluläre (z.B. Phagocytose, Natural Killing) und humorale Reaktionen (z.B. Komplement, Opsonin) von den vielfältigen, eng miteinander vernetzten Regelfunktionen unterscheiden. Als Regelglieder sind eine ganze Reihe endogener Mediatoren (Interferone, Interleukine etc.) beschrieben. Diese sind zum Teil polyfunktional; so ist für einzelne Faktoren des hämatopoetischen Systems (kolonienstimulierende Faktoren, CSF) die zellspezifische mitogene ebenso wie zelldifferenzierende und funktionell aktivierende Wirkung nachgewiesen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einige in der Praxis als paraspezifische Immunstimulantien (Paramunitätsinducer, Biological Response Modifier) bewährte Präparate auf ihre Fähigkeit, kolonienstimulierende Faktoren zu induzieren, zu untersuchen. Hierzu sollten vorhandene Testsysteme auf ihre Brauchbarkeit überprüft, unseren Laborbedingungen angepaßt und bezüglich Aussagewert verbessert werden. Besonderer Wert wurde dabei auf die Entwicklung eines praxisnahen, einfachen Testsystems gelegt.



2. Schrifttum

2.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN DER HÄMATOPOESE

2.1.1 Hämatopoetische Stammzelle

In der embryonalen Entwicklungsphase treten erste hämatopoetische Zellen in der Dottersackwand bei der Maus ab Tag sieben auf (61; 94; 96). Von dort wandern sie in die in der weiteren Entwicklung dominierenden hämatopoetischen Organe Leber (elfter Tag) und Milz (61; 70). Im adulten Organismus wird das Knochenmark zum wichtigsten hämatopoetischen Organ, es beherbergt 99% der Stammzellen (91). Zeitlebens werden hämatopoetische Stammzellen auch im zirkulierenden Blut angetroffen (6; 48).

Aus hämatopoetischen Stammzellen können, wie durch genetische Marker-Studien bewiesen wurde, sämtliche Vorläufer der erythroiden und myeloischen wie auch der lymphatischen Blutzellen gebildet werden (2; 64; 93). Somit ist durch Transplantieren von Stammzellen die völlige Rekonstitution eines letal bestrahlten Individuums möglich (48; 57). Diese multipotenten Stammzellen bilden beim Recipienten hämatopoetische Inseln in der Milz, welche verschiedene Blutzellreihen enthalten (mixed colonies); sie werden daher als "kolonienbildende Einheit in der Milz" bezeichnet (CFU-S: colony forming unit in the spleen) (2; 58; 131).

Diese CFU-S können rein morphologisch nicht von anderen, bereits differenzierten Zellen, wie beispielsweise Lymphozyten, unterschieden werden. Sie können aber mit Hilfe ihres unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens in Kombination mit Fluoreszenz-Activated Cell Sorting (FACS) differenziert und auch angereichert werden (118). In vivo (56) und in vitro, bei entsprechender Mikroumgebung (129), können sich CFU-S selbst regenerieren; sie bilden damit lebenslang das Ausgangskompartiment für alle Vorläuferzellen von Blutzellen (siehe 2.1.2).

2.1.2 Determinierte Vorläuferzellen (Progenitoren)

Aus einer Stammzelle entwickeln sich bei entsprechender Induktion Progenitoren. Diese sind bereits determiniert für wenige oder nur eine Reihe von Blutzellen. Morphologisch sind diese Zellen voneinander nicht unterscheidbar, jedoch lassen sie sich funktionell durch klonale Kultivierung in halbflüssigen Medien differenzieren (9; 85). Die Benennung der Progenitoren erfolgt nach diesem Verhalten als "kolonienbildende Einheit in der Kultur" (CFU-C: colony-forming unit in culture, oder CFC: colony-forming cell) (9). Die Fixierung der CFC wird durch vorangestellte Großbuchstaben als Abkürzung für den sich differenzierenden Zelltyp angegeben (z.B. GM-CFC für Progenitorzellen aus der sich Granulozyten und Makrophagen entwickeln; s. Abb. 1). Nicht für alle Effektorzellen ist der hämatopoetische Stammbaum lückenlos aufgeklärt. So ist beispielsweise der Verwandtschaftsgrad von bestimmten lymphatischen Zellen, wie z.B. Natural Killer Zellen (NK), Natural Cytotoxic Zellen (NC), Natural Cytotoxic T Zellen (NCTC) und Cytotoxic T Lymphocyten (CTL), welche durch funktionelle Studien und anhand von Oberflächenmarkern unterscheidbar sind, noch nicht geklärt (43). Progenitoren für folgende Effektorzellen sind bereits durch klonale Kultivierung definiert (Überblick bei 131):

Erythrozyten (E-CFC; BFU-E [Burst Forming Unit]) (13; 62; 133)

neutrophile Granulozyten (G-CFC)(154)

Makrophagen (M-CFC)(67)

neutrophile Granulozyten und Makrophagen (GM-CFC)(9; 14)

eosinophile Granulozyten (Eo-CFC)(14;90)

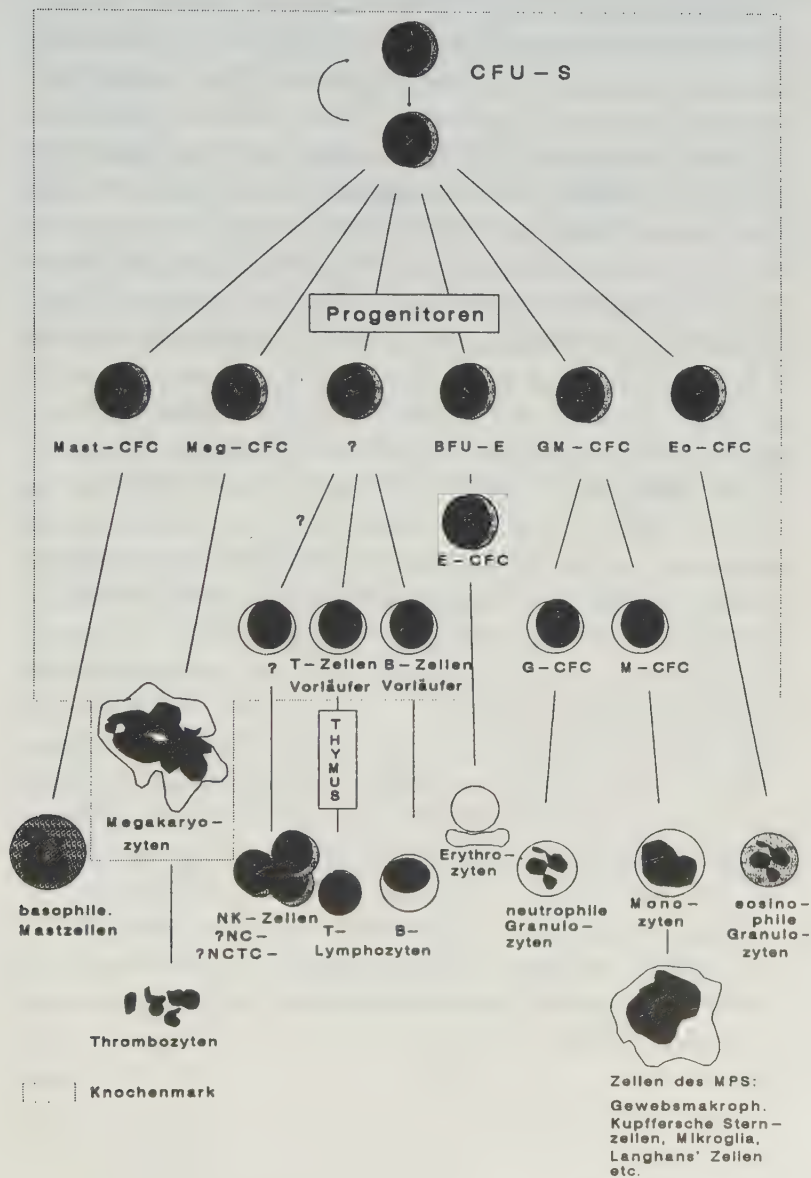
Megakaryozyten (Meg-CFC = MK-CFC)(14)

Mastzellen (Mast-CFC = MC-CFC)(152)

Mit Hilfe von genetischen Markierungsexperimenten konnte eine für T-Zellen fixierte Progenitorzelle (T-Cell Stem Cell) in vivo nachgewiesen werden (2). Die Existenz einer Prä-T-Zelle im Knochenmark wurde durch Rekonstitution von bestrahlten Thymus-Organokulturen

bestätigt (46). Die klonale in vitro Kultivierung von lymphatischen Progenitoren aus dem Knochenmark bereitet im Gegensatz zur erythroiden und myeloischen Zellreihe große Schwierigkeiten, da die entsprechenden Wachstumsfaktoren nicht zur Verfügung stehen. Es werden aber aufgrund verschiedener in vivo Beobachtungen für alle lymphatischen Effektorzellen entsprechende CFC postuliert (2; 9; 124). Inwieweit in der lymphatischen Reihe funktionell definierte Effektorzellen sich aus anderen entwickeln können, ist nicht geklärt. Derartige *horizontale* Verwandtschaftsverhältnisse werden diskutiert (2). Die in vitro Kultivierung leukämischer Zellen sowie Untersuchungen über deren Oberflächenantigene beweisen, daß eine neoplastische Transformation auf verschiedenen Ebenen der Differenzierung stattfinden kann (72; 85; 91; 95; 104; 128). Das Studium der unterschiedlichen Leukämien gibt damit nebenbei ebenfalls wertvolle Hinweise zur Aufklärung hämatopoetischer Verwandtschaftsverhältnisse. Ein grobschematischer Überblick über den hämatopoetischen Stammbaum wird in Abbildung 1 gegeben.

Abb. 1: Hämatopoetischer Stammbaum modifiziert nach (57; 85; 124; 132)



2.2 WACHSTUMSFAKTOREN DES HÄMATOPOETISCHEN SYSTEMS

2.2.1 Geschichte und Nomenklatur

Das Wachstum von Progenitoren ist nur möglich in Gegenwart entsprechender hämatopoetischer Faktoren (91). In ersten Untersuchungen (*Bradley und Metcalf* (9)) wurden in vitro hämatopoetische Kolonien durch Kokultivierung von Knochenmarkzellen mit *feeder layer* Zellen erzeugt. Später wurde im allgemeinen den Kulturen exogen konditioniertes Medium als Quelle für Wachstumsfaktoren zugeführt (85). Konditionierte Medien sind Zell- oder Organkulturüberstände; sie enthalten mehrere biologisch aktive Mediatoren, darunter hämatopoetische Faktoren. Nach ihrer Eigenschaft, in vitro aus Vorläuferzellen das Wachstum von Kolonien in halbflüssigen Medien zu stimulieren, wurden diese Faktoren mit dem Terminus CSF für *colony stimulating factor* oder synonym CSA für *colony stimulating activity* bezeichnet. In den 70-iger Jahren wurde intensiv über die Herkunft, die biologische Wirkung und die biochemische Natur dieser, wie sich herausstellte, vielfältigen Faktoren geforscht. Je nach stimuliertem Kolonientyp wurde der Arbeitsbegriff CSF durch Präfixes entsprechend erweitert (G- für Granulocyten-CSF usw.; analog zur Nomenklatur der CFC s. 2.1.2). Kompliziert wird das Nomenklatursystem aufgrund folgender Tatsachen:

1. Das Wachstum von Kolonien eines Zelltyps kann durch mehrere Faktoren induziert werden (z.B. GM-Kolonie durch GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL3 (87)).
2. Einzelne Faktoren stimulieren verschiedene Kolonien (IL3: G-CFC, M-CFC, GM-CFC, E-CFC...)(60;86).
3. Kolonienstimulierende Faktoren haben neben ihrer namensgebenden Eigenschaft viele weitere biologische Funktionen, welche durch andere Arbeitsbegriffe beschrieben werden (z.B. IL3: Enzymaktivierung von 20 α SDH (61), Arginase (123)).

4. Die Wirksamkeit kleinster Mengen (10^{-12} M)(91) stellt sehr hohe Anforderungen an den Reinheitsgrad biologisch hergestellter CSF, um eine Fehlinterpretation durch Kontamination zu vermeiden.
5. Je nach Testsystem und beobachteter Wirkung verwenden einzelne Arbeitsgruppen ihre eigenen Termini.

Zwangsläufig kommt es damit zu Mißverständnissen beim Studium der Literatur. Eine Vereinheitlichung wird vom Komitee für Nomenklatur der International Union of Immunological Societies (IUIS) angestrebt, de facto ist sie derzeit nicht erreicht (117).

Schließlich kann die exakte Definition eines Mediators und die Zuweisung seiner biologischen Funktionen erst vorgenommen werden, nachdem

- die biochemische Struktur aufgeklärt ist
- für wissenschaftliche Untersuchungen ausreichende Mengen gentechnologisch oder synthetisch hergestellte Reinsubstanzen existieren
- der entsprechende Rezeptor bekannt ist
- spezielle Antikörper gegen Mediator und Rezeptor existieren.

Als Beispiel (siehe auch Tab 2) sei das mittlerweile synthetisch hergestellte Interleukin 3 angeführt (23):

Die funktionellen Begriffe

- multi-CSF (87)
- BPA (burst promoting activity)(91)
- PSF (persisting-cell stimulating factor)(24)
- MCGF (mast-cell growth factor)(60)
- Meg-CSF (MK-CSF)((91)
- 20α SDH elevating factor (60,61)
- HCGF (histamine producing cell growth factor) (60,7)

können alle auf diese eine Substanz zurückgeführt werden. Der Begriff

"Faktor" sollte daher nur für hochgereinigte oder biologisch genau definierte Substanzen (z.B. durch Antikörper) verwendet werden. Andernfalls, bei teilgereinigten Substanzen oder biologischen Flüssigkeiten mit kolonienstimulierenden Eigenschaften, ist der Begriff CSA (colony stimulating activity) zu verwenden (57).

2.2.2 Regeneratives Prinzip

In vitro konnte über Kurz- und Langzeitkulturen (>3 Wochen) mit Hilfe kolonienstimulierender Faktoren Myelopoese und Erythropoese ausgehend von der Stammzelle weitgehend nachvollzogen werden. In vivo ist die Bedeutung der dabei eingesetzten Faktoren nur teilweise aufgeklärt. Die Ursache dafür liegt:

1. in der extrem kurzen Halbwertszeit in vivo von exogen zugeführtem CSF (Serum-Halbwertszeit von exogen zugeführtem CSF initial bei 5-15 min, dann zwischen 0.5-7 h (86)),
2. in den komplexen Steuermechanismen mit vielen Interaktionen zwischen einzelnen Mediatoren,
3. in der mangelnden Verfügbarkeit reiner Präparate (z.B. können aus 150 l WEHI-3B konditioniertem Medium ca. 2-10 µg IL3 Protein hergestellt werden (59)).

Erste in vivo-Experimente mit hochgereinigtem bzw. gentechnisch synthetisiertem multi-CSF (IL3) (10;88), GM-CSF (10) und M-CSF beweisen zumindest eine hämatopoetische Relevanz. Dauerinfusion von humanem, rekombinanten G-CSF führte bei Rhesusaffen zu drastischer Neutrophilie (33).

Ein G-CSF produzierender Tumor verursacht eine mit der Tumorgroße korrelierende Granulozytose. Dieser Effekt kann durch exogen zugeführte G-CSF Antikörper neutralisiert werden (153). Indirekte Hinweise für die hämatopoetische Relevanz von CSF sind gegeben:

1. durch meßbare CSA Gehalte im Serum und in unterschiedlichen Geweben
2. durch stark erhöhte Serum CSA Gehalte mit konsequenter Erhöhung der Zellzahl bestimmter Blutzellreihen nach entsprechender Stimulation (s.Tab. 3)
3. durch periodische Schwankungen in CSF-Gehalten und in der Zahl analoger Targetzellen (59).

Die komplexen Steuermechanismen der Hämatopoese können auf verschiedenen Ebenen gestört sein. Einige endogene bzw. hereditäre Erkrankungen des hämatopoetischen Systems (Cytopenien, Leukosen) lassen sich bereits detailliert auf einen gestörten Regelmechanismus zurückführen. Bei pancytopenischen Rhesusaffen wurde durch Dauerapplikation von gentechnisch hergestelltem hu-GM-CSF ein starker Anstieg aller Blutzellfraktionen erreicht (33).

Schrader (126) hat beobachtet, daß aus faktorenabhängigen Zellen des Knochenmarks *in vitro* bei Langzeitkulturen Klone entstehen, welche ohne Zusatz des ursprünglich benötigten Wachstumsfaktors (IL3) weiterwachsen und *in vivo* sich zu soliden Tumoren entwickeln können. Kulturüberstände von solchen Subklonen enthalten den ursprünglich benötigten Wachstumsfaktor. Daraus leitete er die Hypothese ab, daß hämatopoetische Zellen über ein autokrines Stadium zu Tumorzellen werden können. Andererseits können hämatopoetische Faktoren leukämische Zellen zur Differenzierung bringen (125). So können die Subklone D+ der Mastomyelozytomlinie WEHI 3B, welche IL3 produzieren, durch G-CSF zu Granulozyten differenziert werden (95). Bei transformierten Zellen von humaner akuter nichtlymphatischer Leukämie (ANLL) ist ebenfalls ein Wachstumsstop *in vitro* und *in vivo* durch Applikation von G-CSF (95;128) bzw. durch Induktoren von CSF (122) gelungen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Rekrutierung myeloischer, lymphatischer und erythroider Effektorzellen von einer gemeinsamen Stammzellenpopulation (CFU-S) ausgeht. Über endogen

produzierte, exogen stimulierbare, lösliche Faktoren wird die Determinierung von Vorläuferzellen, das Wachstum der determinierten Zellpopulationen und die Differenzierung zu postmitotischen Effektorzellen gesteuert. Weitere biologische Aktivitäten der kolonienstimulierenden Faktoren werden in Kapitel 2.3 dargestellt.

2.2.3 Übersicht derzeit bekannter Faktoren

Bisher sind ausschließlich CSF von Maus und Mensch untersucht worden. Biochemisch von der Maus vollständig charakterisiert sind:

G-CSF (86)

GM-CSF (155)

M-CSF (86)

IL3 (multi CSF (17;38;42))

und vom Menschen:

G-CSF (CSFB)(102)

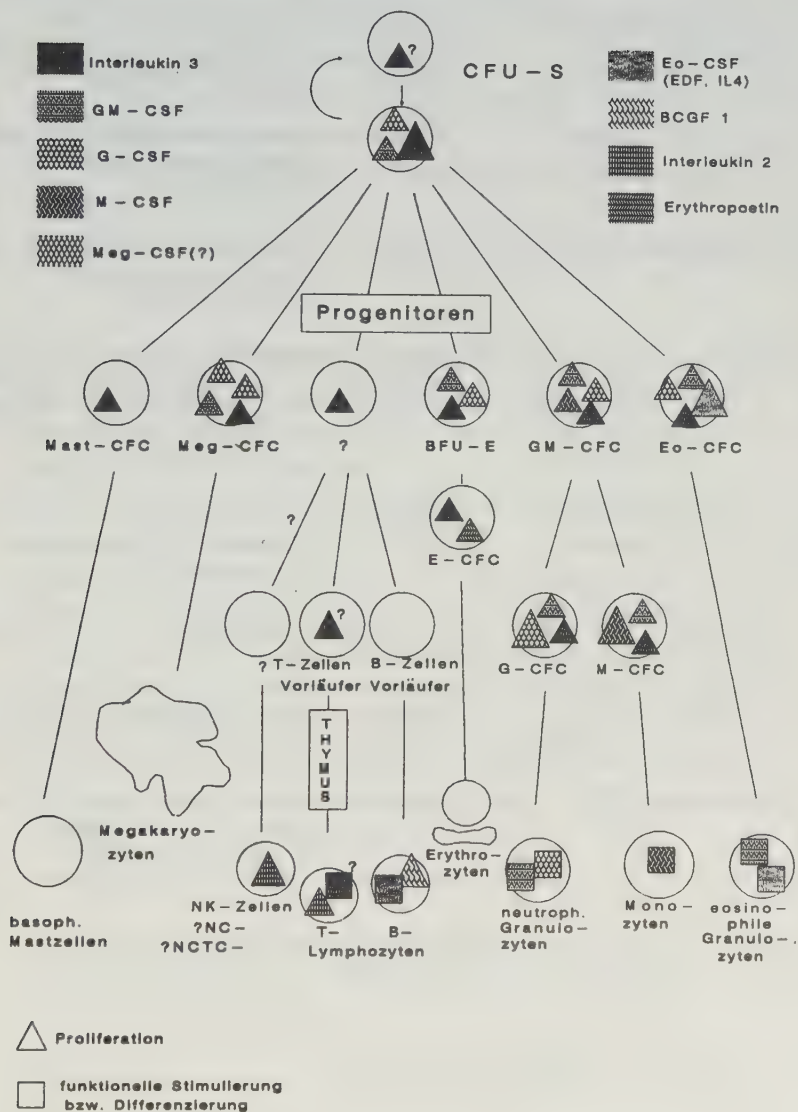
GM-CSF (CSF α)(18;146)

M-CSF (CSF-1)(113;114)

EDF (Synonyma: BCGF2;Eo-CSF;IL4), ein weiterer, von T- Zellklonen produzierter CSF, unterscheidet sich aufgrund biologischer Eigenschaften von den oben genannten (74;107;140).

Die im älteren Schrifttum häufigen Bezeichnungen für Aktivitäten werden hier weniger berücksichtigt als vielmehr Faktoren, die in reiner Form verfügbar bzw. in ihrer Aminosäurenstruktur definiert sind. Nachweisbare Unterschiede in chromatographischen Untersuchungen haben nur begrenzte Aussagekraft, da es sich bei nativen CSF um Glykoproteine handelt, die je nach Kohlenhydratanteil oder Proteinbindung ein unterschiedliches Verhalten zeigen.

Abb. 2: Zielzellen von Wachstumsfaktoren



Faktor	Synonyma	Klo- nie- rung	Molekularge- wicht (Dalton) *Peptidanteil	in vitro Kolonien aus Knochenmarkszellen	Referenz
mu M-CSF	CSF 1 MGI-1M	+	70.000 dimer *14.000	Makrophagen,(neutr. Granuloz.+Makroph.) ¹⁾	(87,86)
mu G-CSF	MGI-1G	+	25.000	neutr. Granulozyten, (Makrophagen + neutr. Granulozyten) ¹⁾	(104,87)
mu GM-CSF	MGI-1GM	+	23.000 *14.138	neutr. Granulozyten, Makrophagen, Makroph. + neutr. Granuloz.	(87,86)
IL 3	multi-CSF, PSF,MCGF, WEHI-CSF BPA, HCGF u.a.	+	*15.142 23.000 bis 28.000	Erythrozyten, neutr. (u. eos.)Granulozyten, Makrophagen, Mega- karyozyten, Mastzellen gemischte Kolonien	(7,17,23, 24,26,38, 42,60)
IL 4	Eo-CSF, BCGF2	-	44.000	eos. Granulozyten (Makroph.+ neutroph. Granulozyten) ¹⁾	(74,107, 140)
hu M-CSF	CSF 1	+	70.000 dimer *14.500	Makrophagen	(113,114)
hu G-CSF	CSF 8 Pluripoietin	+	30.000 19.600	neutr. Granulozyten, und wie IL 3	(102,111, 128,153)
hu GM-CSF	CSF α , NIF-T	+	22.000	neutr. Granulozyten+ Makroph., neutr.Granu- lozyten, Makrophagen	(18,146)

Tab. 2.1: Kolonienstimulierende Faktoren des Hämatopoetischen Systems, (ergänzt nach (86,87))

¹⁾erst bei hoher Konzentration des Faktors

Für alle oben angeführten CSF gelten folgende Eigenschaften:

1. Sie sind absolut notwendig für das Wachstum von entsprechenden Kolonien aus Knochenmarkzellen.
2. Sie sind notwendig für das Überleben von Vorläuferzellen und von Effektorzellen *in vitro* (84).
3. Die Richtung der Entwicklung von Stamm- und Vorläuferzellen wird festgelegt (commitment).
4. Vielfältige funktionelle Abwehrleistungen von Effektorzellen werden stimuliert (vgl. Tab. 2.4).
5. Targetzellen von CSF werden zur Bildung von Mediatoren und Rezeptoren angeregt.

Biochemisch sind alle CSF Glykoproteine, wobei der Kohlenhydratanteil für ihre kolonienstimulierende Aktivität nicht notwendig ist. Die Peptidketten sind monomer für GM-CSF, G-CSF und IL3, M-CSF ist nur in dimerer Form wirksam.

Die cDNA Sequenzen der CSF lassen keinerlei Verwandtschaft der einzelnen CSF erkennen (Ref. in Tab. 2.1). Interspezifische Homologien zwischen humanen und murinen CSF sind signifikant (z.B. bei G-CSF 50%), auch biologisch sind Kreuzreaktionen beobachtet worden (87).

Homologien mit anderen, nicht hämatopoetischen, klonierten Wachstumsfaktoren (*Epidermal Growth Factor*, *Platelet Derived Growth Factor*) existieren nicht. Für G-CSF und GM-CSF der Maus wird ein gemeinsamer Regelmechanismus aus folgenden Gründen diskutiert:

1. Räumliche Nähe der codierenden Sequenzen auf Chromosom Nr.11(87)
2. häufig (immer?) gemeinsames Auftreten (s. Tab. 2.3)
3. funktionell ähnliche Eigenschaften

Die Zielzellen der einzelnen CSF werden in Abbildung 2 und Tabelle 2.1 vergleichend dargestellt.

Zellen/Organe für die in vitro Produktion	Stimulus	induzierter Faktor	Referenz
1.Organe: Lunge, Herz, Niere Skelettmuskel,Thymus Knochen, Speichel- drüse, Gehirn, Placenta	Endotoxin [in vivo Vor- behandlung]	GM-CSF,G-CSF	103,66
	-	CSF α + β (G-,GM-)	85,104
2.Zellen (ex vivo): Milzzellen	PHA, ConA, MLC	IL 3, E-,Eo-, GM-,Meg-CSF	56,85
T-Zellen	Mitogen allo-H2Ag.	IL 3, E-,Eo-, Meg-,GM-CSF	57,66,132
Makrophagen	diverse Subst. aus Bakterien ConA, PHA	GM-, M-CSF	68,91,120
LGL (large granular lymphocyte)		CSF	64
Stromazellen des Knochenmarks	Lipid A	GM-CSF	56
Epidermale Zellen	(Mitogen)	IL 3, ETAF	75,76
3.Zelllinien(Auswahl): EL 4 (T-Zelllinie)	-	IL 3	76
WEHI-3B(Mastomyelo- zytom)(Maus)	-	IL 3	60,149
L-Zellen (Fibrobl.)	-	M-CSF	66
Nierenzelllinie (Ratte)	-	GM-CSF	147
Harnblasenkarzinom (Mensch)	-	plurip. CSF	144
AKR antiB6 (T-Zell- linie)	ConA, B6- somat.Ag.	GM-,E-,Eo-, Meg-CSF	132
T-Hybridomz.NIMP Th1	PMA	EDF(Eo-CSF)	140
Mia, PANC (Pancreascarzinome)	-	CSF-1	113

Tab. 2.2: Biologische Quellen für kolonienstimulierende Faktoren

Vorbehandlung in vivo	induzierter Faktor/Aktivität	Referenz
Schistosoma japonicum	GM-CSF	109
Zymosan	CSF	69
Lactobacillus casei	CSA(GM-CSF?)	150
Listeria	CSA	151
BCG (Bacillus Calmette Guerin)	CSA	70,34
Bordetella	CSA	34
Pertussis Toxin	IL3,CSF-1	52
Brucella	CSA	34
Corynebacterium parvum (=Propionibacterium acnes)	CSF	34,37, 150
Nocardia rubra (Zellwand)	CSF	51
Tuberkulin	CSF	69
MVE 2(maleic anhydride divinyl ether copolymer) .	CSA	121
Muramyl Peptid	CSA	39,40
LPS (Lipopolysaccharid)	GM-,Meg-,Eo-CSF	5,14,110
Lipid A	GM-,Meg-,Eo-CSF	57
T-Zell Mitogene ConA;PHA;PWM	IL 3;GM-,Meg-, Eo-, E-CSF	14,69,110
Azimexone	CSF	121
Polynucleotide (Poly I:C)	CSF	34,69,120
Transplantate (bei GVH-Reaktion)	PSF(IL3)	27
Tumor Necrosis Factor	GM-CSF	100

Abb. 2.3: Übersicht verschiedener Induktoren für kolonienstimulierende Faktoren/Aktivität bei Mäusen

Die Synthese der CSF wird von unterschiedlichen, nicht nur dem hämatopoetischen System angehörigen Zellen bewerkstelligt (siehe Tab.2.2).

Eine Stimulierung *in vitro* wie *in vivo* kann durch unterschiedliche Substanzgruppen erreicht werden (Referenz s. Tab. 2.2):

- Mitogene (PHA, ConA, PWM, LPS)
- Histokompatibilitätsantigene (H2-Locus; bei GVH- Reaktion)
- metazoische Parasiten
- Bakterien und gereinigte Fraktionen aus diesen
- Polyanionen
- Immunmediatoren

Hierdurch wird die Bedeutung der CSFs bei der Abwehrreaktion des Immunsystems unterstrichen.

2.3 BEDEUTUNG DER WACHSTUMSFAKTOREN FÜR DAS KÖRPEREIGENE ABWEHRSYSTEM

Das gesamte Netzwerk des Immunsystems läßt sich aus didaktischen Gründen in einen spezifischen und einen paraspezifischen Teil gliedern. Der spezifische Anteil wird dabei begrenzt auf alle Funktionen, die zu einer humoralen oder zellgebundenen Immunität führen, während der paraspezifische alle Mechanismen umfaßt, die einerseits nicht antigen-spezifisch gegen Noxen gerichtet sind und andererseits bei spezifischen Immunreaktionen für einen geregelten Ablauf sorgen. Beim paraspezifischen Anteil des Immunsystems spielen Mediatoren, die die gesamte Palette von funktionellen Leistungen steuern, eine wesentliche Rolle. Sie sind verantwortlich für die Bereitstellung einer ausreichenden Zahl kompetenter Abwehrzellen zur rechten Zeit am richtigen Ort und für die Vorbereitung (priming) und Stimulierung zu entsprechenden Leistungen.

Die besondere Bedeutung der kolonienstimulierenden Faktoren in diesem Zusammenhang wird erst seit kurzer Zeit diskutiert (36, 87, 113). Zwar ist seit längerem das vermehrte Auftreten von kolonien-

stimulierender Aktivität im Serum bzw. in Zellkulturüberständen nach Stimulierung durch Antigen (neben der klassischen durch Mitogene) bekannt (siehe Tab. 2.2 und 2.3), die Bedeutung der CSFs als funktionelle Stimulationssignale konnte erst bewiesen werden, nachdem reine Präparate zur Verfügung standen. Heute weiß man, daß kolonienstimulierende Faktoren zumindest an folgenden Abwehrmechanismen primär beteiligt sind (Ref. siehe Tab. 2.4):

- Aktivierung der antikörperabhängigen Zytotoxizität (ADCC) neutrophiler und eosinophiler Granulozyten
- Natürliche Zytotoxizität von Makrophagen
- Stimulierung der Phagozytose opsonierter oder komplementierter Partikel durch Mikro- und Makrophagen
- *intracellular killing* phagozytierter Mikroorganismen
- Synthese und Aktivierung von Enzymen
- Freisetzung weiterer Mediatoren und damit Anregung weiterer Steuermechanismen (*Plasminogen activator, Prostaglandin E, IL 1, Interferon, TNF*)
- Immobilisierung von Effektorzellen am Reaktionsort
- Verbesserung der Stimulierbarkeit von Superoxid- Anionen als zytotoxisches Prinzip
- Expression von Rezeptoren (z.B. für Komplement)
- Erhöhung der Immunglobulinsynthese

Die rasche Freisetzung von CSF nach entsprechender Stimulation (höchste Serumwerte bereits nach wenigen Stunden (39;131)) und die oben genannten funktionellen Aspekte belegen eindeutig, daß kolonienstimulierende Faktoren neben ihrer "klassischen" Aufgabe eine entscheidende Bedeutung in der sofortigen Abwehrreaktion haben. Der Nachweis von kolonienstimulierender Aktivität im Serum gibt damit wertvolle Hinweise für den Zustand der Abwehrbereitschaft eines Individuums, konkrete Aussagen über eine allgemeine, erregerspezifische Schutzfunktion gegen Infektionskrankheiten im Sinne von Paramunität (Definition bei (77)) können jedoch nicht gemacht werden. Hierzu fehlen notwendige Untersuchungen über die Bedeutung von CSF im Verlauf pathogenetischer Ereignisse bei Infektionskrankheiten.

biologische Funktion in vitro	Faktor	Referenz
Aktivierung der antikörperabh. Zytotoxizität von neutrophilen Granulozyten	hu-G-CSF	74,111,137
Aktivierung der antikörperabh. Zytotoxizität von eosinophilen Granulozyten	IL 4 (EDF)	74,137,138
Inhibition der Mobilität neutr. Granuloz.	hu-GM-CSF	36,143
Induktion von 20 α SDH in Milzzellen von Thymuslosen Mäusen	IL 3	60
Induktion von 20 α SDH in Makrophagen	GM-CSF	50
Stimulierung der Phagozytose opsonierter oder antikörpergebundener		
- Staphylokokken	hu-GM-CSF	36
- Hefen	IL 4 (EDF)	74
intracellular killing phagozytierter Mikroorg.	G-,GM-CSF	36
Expression von C3b Rezeptor auf eos. Granuloz.	IL 4	74
Steigerung der IgG und IgM Sekretion	IL 4	107
Notwendigkeit für das Überleben von		
- neutrophilen Granulozyten	G-,GM-CSF	87
- eosinophilen "	IL 4	74
Erhöhung der Stimulierbarkeit von Granulozyten zur Superoxid-Anionen Freisetzung	hu-GM-CSF	143
Stimulierung von Monozyten/Makrophagen zu elektronenmikroskopisch erkennbar aktivierten Formen	M-CSF	4
Stimulierung von Makrophagen zu:	M-CSF	113
- Mediatorenproduktion (PgE, IFN, G-CSF, IL 1, Plasminogen-Aktivator, Ferritin)		(review)
- intrazelluläre Abtötung von Candida		
- Natural Cytotoxicity		
- Resistenz gegen VSV-Virus		
- Produktion von Oxygen-Metaboliten		

Tab. 2.4: Nicht-kolonienstimulierende Eigenschaften unterschiedlicher CSF

3. Eigene Untersuchungen

3.1 MATERIAL UND METHODEN

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Inducer auf ihre kolonienstimulierende Funktion kamen zwei verschiedene Testsysteme zum Einsatz:

1. Mäuse wurden in vivo vorbehandelt und nach unterschiedlichen Vorbehandlungszeiten entblutet. Die kolonienstimulierende Aktivität der Seren wurde in vitro getestet. Errechnet wurde dabei die Kapazität der Seren in Relation zu einer Standard-CSF-Quelle (Kulturüberstand von Pokeweed-Mitogen-stimulierten Milzzellen, PWM-SCM).
2. Einen Tag nach in vivo-Vorbehandlung wurde die Anzahl kolonienbildender Zellen aus 2.5×10^4 Knochenmarkzellen bei Zugabe einer Standard-CSF-Quelle in vitro bestimmt. Diese Versuchsanordnung wurde nur bei PIND-ORF- vorbehandelten Tieren angewendet.

Der Einfluß von fetalem Kälberserum auf die in vitro- Kultivierung von Knochenmarkszellen wurde unter Verwendung der Interleukin 3 produzierenden Zelllinie WEHI-3B untersucht. Hier wurden FCS haltige und serumfreie WEHI-3B-Kulturüberstände (WEHI-3B-CM) vor und nach Konzentrierung in bezug auf ihre kolonienstimulierende Eigenschaft miteinander verglichen.

3.1.1 Tiermaterial

Die Experimente wurden mit weiblichen Mäusen des Auszuchtstammes NMRI durchgeführt. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn mindestens eine Woche im institutseigenen Tierstall unter konventionellen Bedingungen gehalten (Makrolonkäfige, pelletiertes Alleinfutter und Leitungswasser aus Tropfflaschen ad libitum). Zur Serumgewin-

nung wurden Mäuse mit 30 ± 5 g verwendet, bei der Milz- bzw. Knochenmarksentnahme waren die Tiere ca. 20-25 g schwer. In einem Experiment zur Bestimmung der relativen Anzahl kolonienbildender Zellen aus dem Knochenmark nach in vivo Vorbehandlung wurden Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 eingesetzt.

3.1.2 Vorbehandlung der Mäuse und Gewinnung von Seren

Die unterschiedlichen Testsubstanzen (Mengen bzw. Dosen und Vorbehandlungszeiten siehe 3.2) wurden grundsätzlich intraperitoneal appliziert. Kontrolltiere wurden bei allen Experimenten mit 0.2 ml physiologischer Kochsalzlösung vorbehandelt, einige Male wurde zusätzlich Serum von unbehandelten Mäusen dazugenommen. Nach der jeweiligen Vorbehandlungszeit wurden die Tiere in tiefer Narkose (3 mg Ketamin, 0.3 mg Xylazin pro 30 g Maus, i.p.) durch sterile Herzpunktion mit 0.90x38 mm Einmalkanülen auf 5 ml Einmalspritzen entblutet. Das Blut der jeweils drei Mäuse umfassenden Vorbehandlungsgruppen wurde gepoolt, bis zur Gerinnung bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Nach Zentrifugieren (10 min bei 2000g) wurden die Seren abgenommen und bis zum Test bei -18°C tiefgefroren. Serumverdünnungen (i.R. 1:6) wurden mit physiologischer Kochsalzlösung (pH 7.4) hergestellt.

3.1.3 Herstellung von Zellsuspensionen aus Mäuseorganen

Zur sterilen Organentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und anschließend das Fell mit Äthanol (70%) gereinigt.

3.1.3.1 Knochenmarkzellen

Unter sterilen Kautelen wurde das Fell der kaudalen Körperhälfte abpräpariert und ein Femurknochen von der umgebenden Muskulatur

gelöst. Anschließend wurde der Femurhals durch einen Scherenschlag abgesetzt und der Knochen mit der Pinzette an der Diaphyse gefaßt und durch Drehen aus der distalen Epiphyse gelöst. Die so isolierte Femurdiaphyse wurde über eine distal aufgedrehte Kanüle (0.9x38mm) mit ca. 3 ml gekühlter PBS- Lösung durchgespült. Danach wurde das Knochenmarkgewebe durch vorsichtiges Pipettieren mit einer Glaspipette (5 ml) in eine Einzelzellsuspension übergeführt und bis zur weiteren Verwendung im Eiswasserbad aufbewahrt.

3.1.3.2 Milzzellen

Die steril entnommenen Milzen wurden in eisgekühlter PBS-Lösung jeweils bis zur Verwendung aufbewahrt. Zur Herstellung einer Zellsuspension wurden die Organe mit einer Schere in kleine Stückchen zerschnitten und zur Entfernung des Bindegewebes mit einem Kunststoffstempel durch ein feines Stahlsieb gedrückt. Nach Durchspülen des Siebes wurde die Milzpulpa in PBS- Lösung durch mehrmaliges Pipettieren in eine Zellsuspension übergeführt.

3.1.4 Permanente Zell-Linie

Als Interleukin-3 Produzent wurde die aus einem Masto- Myelo-Zyтом einer BALB/c -Maus etablierte Linie WEHI-3B (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Lothar Hültner, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Abt. Hämatologie in München) eingesetzt (88). Die Kultivierung erfolgte in Vierkant-Glaszellkulturflaschen (20 ml) bei 37°C im Brutschrank, als Wachstumsmedium wurde RPMI 1640 mit 20% FCS (Fa. Flow Laboratories, CH 036156) unter Zusatz von 0.3 mg/ml L-Glutamin und Antibiotica (Penicillin, Streptomycin) verwendet. Die Suspensionskultur wurde wöchentlich geteilt (Aussaat: 100 Zellen pro ml).

3.1.5 Zellzählung

Zellsuspensionen wurden zur Lebend-Tot-Färbung mit 0.05%-iger Trypanblaulösung verdünnt (1:20 bei Knochenmarkszellen; 1:100 bei Milzzellen) und anschließend in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden jeweils mindestens 100 lebende Zellen und mindestens vier große Quadrate der Zählkammer gezählt. Zellzahlen wurden grundsätzlich auf lebende und kernhaltige Zellen bezogen eingestellt. Proben mit mehr als 10% toten, d.h. blau gefärbten Zellen wurden verworfen.

3.1.6. Herstellung konditionierter Medien

3.1.6.1 Pokeweed-Mitogen-stimuliertes Milzzellen-konditioniertes Medium (PWM-SCM = Pokeweed – Mitogen Spleen Cell Conditioned Medium)

Für die Standardisierung der Testsysteme wurde eine Standard-CSF-Quelle benötigt. Hierzu wurden in vitro mit Mäusemilzzellen, welche mit Pokeweed Mitogen stimuliert waren, Zellkulturüberstände produziert. Diese Zellkulturüberstände sind mit Pokeweed-Mitogen-stimuliertes Milzzellen-konditioniertes Medium oder kurz PWM-SCM bezeichnet worden. Die Herstellung der PWM-SCM erfolgte in Anlehnung an Metcalf (83;89) folgendermaßen:

2×10^6 Milzzellen pro ml Medium (RPMI 1640 mit 10% FCS, 5×10^{-5} M Dimercaptoäthanol, Penicillin/Streptomycin) werden bei Stimulation mit Pokeweed (Fa. Gibco, Grand Island, NY, USA; Cat.Nr. 670-5360; 5% Zugabe einer 1:15 Verdünnung der frisch aufgelösten Substanz) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Als Zellkulturgefäße bewährten sich Roux-Schalen (100 ml). Bei niederem pH-Wert (Indikator: Phenolrot) wurde mit Natriumbicarbonat (8.8%-ige Lösung) nachgepuffert. Nach fünf Tagen Inkubation wurde der Überstand durch Zentrifugation

(10 min, 1000 g) und anschließende Filtration (0.45 μ m, Fa. Millipore) geerntet und bis zum Test bei 4 °C gelagert. Bei längerer Aufbewahrung wurden die Überstände eingefroren (-18 °C).

3.1.6.2 WEHI-3B konditioniertes Medium (WEHI-3B CM)

Zur Untersuchung des Einflusses von FCS in eingengten Medien (s.u.) auf das Kolonienwachstum von Mäuseknochenmarkzellen *in vitro* wurden serumfreie wie serumhaltige WEHI-3B konditionierte Medien hergestellt. Grundsätzlich wurden 1×10^6 vermehrungsfähige WEHI-3B Zellen pro ml Medium (RPMI 1640, 0.3mg/ml L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin) unter Zusatz von 15 g/ml Eisentransferrin (Fa. Sigma, Taufkirchen) bei serumfreier bzw. mit 10% FCS (Fa. Flow Lab. CH 036156) bei serumhaltiger Inkubation ausgesät. Nach viertägiger Inkubation (37 °C) wurde der Überstand analog zu PWM-SCM (siehe 3.1.6.1) geerntet.

3.1.6.3 Konzentrierung konditionierter Medien

Eine teilweise erforderliche Konzentrierung der konditionierten Medien erfolgte mit einem Ultrafiltrationsgerät (Fa. Amicon, Witten: Model 402). Aufgrund der bekannten Molekulargewichtsbereiche kolonienstimulierender Faktoren ($>20\,000$ Dalton) wurde die Ultrafiltrationsmembran PM 10 mit einer Abtrenngrenze (cut off) von 10 000 Dalton verwendet (85). Das Konzentrat (retinierte Flüssigkeit) wurde mit 0.45 μ m Filtern (Fa. Millipore) sterilfiltriert. Der Konzentrationsfaktor wurde je nach Vortestung gewählt.

3.1.7. Substanzen zur in vivo Vorbehandlung

Als zuverlässiger Induktor für eine hohe kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen wurde das in der Literatur beschriebene Lipopolysaccharid aus gramnegativen Bakterien als eine in vivo-Positiv-Kontrolle für das Testsystem verwendet (5;131).

3.1.7.1 Kontrollen: Lipopolysaccharid und Negativ-Kontrollen

Zur Erzeugung hoher Serum-CSA Spiegel wurde eine Lipopolysaccharid Präparation aus *Salmonella typhimurium* (Fa. Difco, Detroit) bei einer Dosis von 20 mg/kg Maus, gelöst in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung, intraperitoneal verabreicht. Zur Gewinnung negativer Kontrollseren wurden 0.2ml physiologischer Kochsalzlösung (pH 7.4 eingestellt) intraperitoneal appliziert.

Seren unbehandelter Tiere wurden zum Teil als zusätzliche Kontrolle gewonnen.

Als direktes Placebo zum Virusbestandteil (Wirksubstanz) in PIND-ORF wurde einmal eine BEL-Zellkultur, welche nicht mit Virus infiziert war, analog zur Herstellung von PIND-ORF weiterverarbeitet, lyophilisiert und in entsprechender Dosierung angewandt.

Das Lösungsmittel (2% NP40, 100 mM β -Mercaptoäthanol) für die Orf-Virus Hüllpräparation (siehe 3.1.7.4) wurde in analoger Dosierung (Verdünnung) als direktes Placebo für das Virus-Hüllprotein verwendet.

3.1.7.2 Paramunitätsinducer PIND-AVI

PIND-AVI ist ein im Institut hergestelltes Präparat aus attenuiertem Hühnerpockenvirus, Stamm HP1-438, das in primären Hühnerembryo-fibroblastenkulturen (FHE) vermehrt wird. Die verwendeten, grobgereinigten Chargen enthielten vor der Inaktivierung mindestens $10^{7.5}$ KID₅₀ /ml. Die Inaktivierung erfolgt durch Gammabestrahlung mit einer Dosis von 1400 krad (Gesellschaft für Strahlen- und Um-

weltforschung, München-Neuherberg), als Stabilisator wird succinylierte Gelatine (Gelofusine, Laboratories Hausmann Inc., St. Gallen, Schweiz) in einer Endkonzentration von 2.5% zugegeben. Nach Einstellung auf einen pH-Wertes von 7.4-7.6 wird das Präparat lyophilisiert und bis zur Verwendung bei +4 °C gelagert.

Der Wirkungsindex, errechnet im Stomatitis-Vesicularis-Test (Belastung von Babymäusen mit VSV-Virus) (78), ergab bei einer Inducer-Verdünnung von 1:8 für die Charge 121 einen Index von 31, für die Charge 131 einen Index von 75. Eine Dosis-Wirkungs-Relation zur Ermittlung der Wirkungseinheiten (s. PIND-ORF) wurde nicht erstellt.

3.1.7.3 Paramunitätsinducer PIND-ORF

Der Paramunitätsinducer PIND-ORF ist ein ebenfalls im Institut hergestelltes Präparat. Attenuiertes Orf-Virus (Parapoxvirus ovis, Stamm D1701 (79)) wird in sekundären bovinen fetalen Lungenfibroblasten (BEL) vermehrt und, abgesehen von abweichenden Inaktivierungsmethoden, wie PIND-AVI weiterbehandelt.

Die verwendeten Chargen enthielten vor der Inaktivierung mindestens $10^{7.5}$ KID₅₀ /ml vermehrungsfähige Viruspartikel. Charge 032T wurde durch Hitzeeinwirkung - 56 °C über 2.5 Std. - weitestgehend inaktiviert, ein Resttiter von weniger als 2^6 KID₅₀/ml war auf BEL-Zellkultur nachweisbar.

Die Charge 022 wurde durch Zusatz von β -Propiolacton (Fa.Serva) in einer Endkonzentration von 0,04% vollständig inaktiviert (drei BEL-Zellkulturblindpassagen). Im VSV-Test wurden bei beiden PIND-ORF Chargen 640 Wirkungseinheiten (WE)/ml ermittelt (78).

3.1.7.4 Orf-Virus Hüllpräparation¹⁾

Als Ausgangsmaterial für die Extraktion der Hüllproteine wurde Orf Virus, Stamm D1701 (53. BEL-Passage), vermehrt auf einer Rinder-nieren-Zelllinie (BK-Zelle, 7. Viruspassage, $10^{6.3}$ KID₅₀ /ml), verwendet. Die Reinigung erfolgte modifiziert nach *Joklik* (61):

Zur Beseitigung von Zelltrümmern wurde die Virusernte 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Das Virus im Überstand wurde anschließend bei 85000 g (45min) abzentrifugiert, das Pellet in Pufferlösung aufgenommen (10mM Tris- HCL Puffer, pH 7.6) und durch Saccharose Lösung (36%) sedimentiert (85000g, 45min). Das Pellet der Saccharose-Sedimentation wurde nun in Tris-Puffer aufgenommen und in einem Kalium-Tartrat Gradienten (20%-50%, 6500g, 60min) bandengereinigt. Die Bande wurde zweimal in Tris-Pufferlösung pelletiert (85000g, 45min). Das Pellet wurde in Tris-Puffer aufgenommen. Die Hüllproteine wurden analog (10) mit 2%NP40/β-Mercaptoäthanollösung abgetrennt. Die angewendete Dosis betrug 2µg und 0.2µg Hüllprotein/30g Maus (i.p.).

3.1.7.5 Aujeszky Virus

Als Testpräparat wurde ein Impfstamm für Schweine, Hannover H2-HP (431 FHE-Passagen, 12 BHK-Passagen), der im Institut auf BEL-Zellen gehalten wird, verwendet. Der Titer betrug $10^{8.0}$ KID₅₀ /ml (BEL-Zellkultur). Bei der angewandten Dosierung handelt es sich um 10-50 LD₅₀ für NMRI-Mäuse, welche im Rahmen eines Aujeszky-Belastungsmodells mit adulten Mäusen am Institut ermittelt worden war (11,78).

¹⁾ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. W.Strube, Bayer AG, Geschäftsbereich VT-FE Biologie, Wuppertal

3.1.7.6 *Corynebacterium parvum* (*Propionibacterium acnes*)

Das eingesetzte Präparat (Fa. Wellcome, England, Ch. CN776/2) enthält 7mg/ml suspendierte, formalininaktivierte *Propionibacterien*. Zur Konservierung wird vom Hersteller 0.01% Thiomersal zugesetzt. Die Versuchsdosis betrug 0.7mg in 0.2ml für eine 30g schwere Maus (i.p.).

3.1.7.7 *Escherichia coli* (*E.coli*) Lysat ¹⁾

Im Biofermenter kultivierte *E.coli* Bakterien (Stamm 0101 aus der Institutssammlung) wurden konzentriert (1:20), 30min auf 98°C erhitzt, mit 1n NaOH Lösung auf pH 12 eingestellt, 24h bei 37° C lysiert und anschließend mit 1n HCl Lösung auf pH 7.2 eingestellt. Von der so hergestellten Stammsuspension wurden 0.2 ml einer 1:20 Verdünnung pro Maus (30g) intraperitoneal verabreicht.

3.1.7.8 *Bordetella bronchiseptica* Lysat ¹⁾

Als Ausgangsmaterial wurde *Bordetella bronchiseptica*, Nr.2 aus der Stammsammlung des Instituts, verwendet. Die Aufbereitung und Anwendung erfolgte analog zu der *E. coli* Präparation.

3.1.7.9 *Candida albicans*

Als Vertreter mäusepathogener Hefen wurde ein Laborstamm von *Candida albicans* (aus der Institutssammlung) in Sabouraud Bouillon 48h bei 32° C vermehrt, das Wachstumsmedium durch zweimaliges Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung entfernt und die Zellzahl der Hefe-Suspension mit Hilfe des Oberflächenverfahrens nach Ge-

¹⁾ Lysate aus *E.coli* und *B.bronchiseptica* wurden freundlicherweise von Dr. Dr.habil G.Baljer zur Verfügung gestellt

dek (44) bestimmt. Es wurden den Mäusen 2×10^6 und 1.4×10^7 Zellen in 0.2ml physiol. NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert.

3.1.7.10 T-2 Toxin

T-2 Toxin (3-OH-4,15-diacetoxy-8-[3-methyl-butyryloxy]-12,13-epoxy-trichothec-9-ene) wird von Fusarien (*F. tricinctum*, *F. culmorum*, *F. solani*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*) natürlicherweise produziert und ist für Säugetiere in starkes Stoffwechselgift. Klinische Vergiftungssymptome sind Vomitus, haemorrhagische Diarrhoe, Anorexie und Ataxie. Der toxische Mechanismus auf zellulärer Ebene erstreckt sich auf die Inhibition der Initiation der Proteinbiosynthese an Polyribosomen. Die akute LD_{50} bei der Maus wird mit 3.04 mg/kg KGW angegeben (24). Die angewendete Dosis betrug 2.5mg T-2 Toxin/kg (Bezugsquelle: Fa. Sigma, Taufkirchen) bei intraperitonealer Applikation.

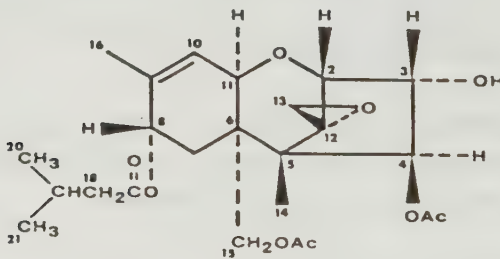


Abb. 3: Struktur des T-2 Toxin

3.1.8 In vitro-Testsystem zum Nachweis von kolonienstimulierender Aktivität im Serum der Maus

3.1.8.1 Kultur hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark im halbflüssigen System

Zur Quantifizierung der relativen Anzahl hämatopoetischer Vorläuferzellen und zur Bestimmung der kolonienstimulierenden Aktivität in Seren sowie in konditionierten Medien wurde ein Kultursystem mit semisolidem Medium gewählt. Eine Agarmatrix fixiert hierbei Kolonien, entstanden aus einer Stamm- bzw. Vorläuferzelle und macht diese so der Quantifizierung zugänglich. Das Agarmedium besteht zu gleichen Teilen aus 0,6%-iger Agarlösung (6g Bacto Agar pro l aqua bidest.) und doppelt konzentriertem Kulturmedium. Als Kulturmedium wurde Dulbecco modifiziertes Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM) mit FCS verwendet. Da sich doppelt konzentriertes Medium mit entsprechenden Zusätzen nicht ohne weiteres in aqua bidest. löst, hat sich folgendes Verfahren zur Herstellung bewährt: In 390 ml aqua bidest. werden im 500ml-Erlenmeyerkolben auf dem Magnetrührer 10.0g DMEM Pulver (Fa. Seromed) und 4.9g Natriumbicarbonat langsam eingerührt. Weiter werden 20 mg L-Asparagin (gelöst in 3ml), 75mg DEAE-Dextran (Fa. Sigma) (gelöst in 2ml), 10^5 IU Penicillin und 100 mg Streptomycin dazugegeben. Das Medium wird mit 0.22 μ Filtern (Fa. Sartorius) sterilfiltriert und in Penicillinfläschchen 30 ml bei 4° C aufbewahrt. Die maximale Lagerungsdauer beträgt einen Monat; bei längerer Lagerung kommt es zum Ausfallen von Mediumbestandteilen.

Fetales Kälberserum (FCS) wurde für alle Tests aus einer auf Brauchbarkeit getesteten Charge (Fa. Boehringer, CH 69441802) entnommen. Die Lagerung erfolgte in gebrauchsfertiger Menge (20ml in Penicillinfläschchen) bei -20° C.

Zum Testansatz wurden jeweils 50 ml aqua bidest. mit 300 mg Bacto Agar (Fa. Difco, Detroit) in einem 500ml- Erlenmeyerkolben erhitzt und nach kurzem Aufkochen im Wasserbad auf 38° C abgekühlt.

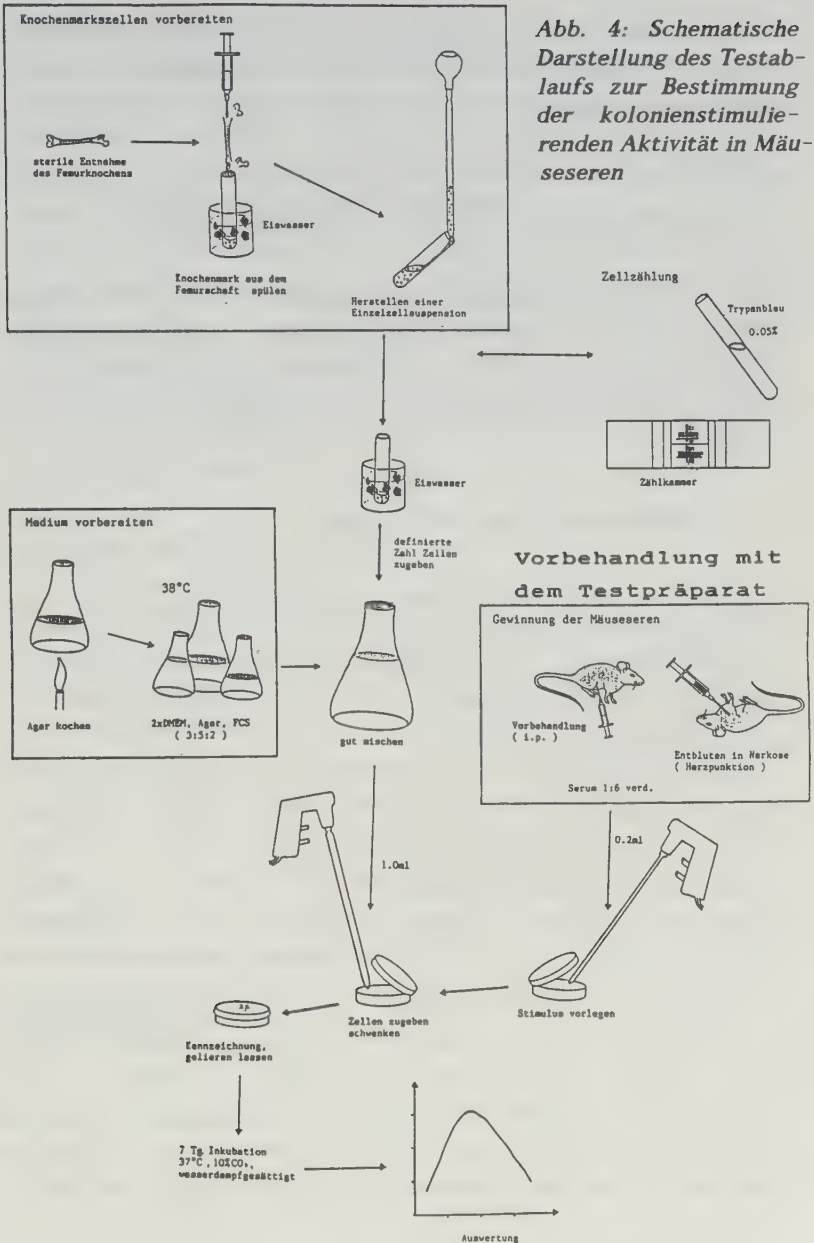
Zugleich wurden 30 ml doppelt konz. Medium und 20 ml FCS auf 38° C erwärmt und anschließend in die Agarlösung gegeben. Zu dem so hergestellten semisoliden Medium (100ml) wurde die gewünschte Anzahl von Knochenmarkzellen gegeben und durch Schwenken und Pipettieren mit einer 25ml-Glaspipette gut gemischt. Je 1 ml der Suspension wurde mit der 10ml-Glaspipette in Plastik-Petrischalen (35mm ø, Fa. Greiner, Nürtingen) mit bereits vorgelegtem Serum bzw. konditioniertem Medium (0.2 ml) gegeben. Dabei sollte die Pipettenspitze keinesfalls mit der vorgelegten Flüssigkeit in Berührung kommen, da bereits sehr kleine Mengen der stimulierenden Flüssigkeit wirksam sind und somit nicht von Schale zu Schale verschleppt werden dürfen. Stimulus und Zellsuspension wurden durch Schwenken der Einzelschälchen gut durchmischt.

Pro Testsubstanz wurden je drei Kulturschalen verwendet, für die in vitro-Positivkontrolle (PWM-SCM Okt85) fünf. Als in vitro-Negativkontrolle wurden je drei Schalen mit 20% phsiol. Kochsalzlösung angesetzt. Alle Arbeiten mit den Petrischalen wurden in der Sterilbank durchgeführt.

Die Kulturen wurden bei 37° C, ca. 10% CO₂ -Partialdruck und voller Wasserdampfsättigung sieben Tage inkubiert.

3.1.8.2 Testauswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem Stereomikroskop (Fa. Wild) bei 32-facher Vergrößerung und indirekter Beleuchtung. Als Kolonie wurde jede Anhäufung von Zellen (dispers oder kompakt) mit mehr als 50 Zellen bewertet. Zur Orientierung beim Durchmustern wurden die Petrischalen auf ein selbstgefertigtes 4mm Quadratraster gelegt. Die Nummerierung der Kulturschalen wurde so vorgenommen, daß eine "Blindauswertung", d.h. eine Auswertung ohne Kenntnis der zugrundeliegenden Stimulationsflüssigkeit bzw. Knochenmarksherkunft möglich war. Bei Serum-CSA Testen wurden grundsätzlich prozentu-



ale Werte gemessen an der Kolonienzahl der Standard CSF-Quelle (PWM-SCM Okt85) im jeweiligen Test folgendermaßen errechnet:

$$\text{Kolonienwachstum in \%} = [\frac{1}{3} (t_1 + t_2 + t_3) : \frac{1}{n} (k_1 + \dots + k_n)] \times 100$$

t = Kolonienzahl einer jeweiligen Kulturschale

k = " " mit PWM-SCM stim. Kulturschale

n = Zahl der PWM-SCM stim. Kulturschalen (i.d.Rgl.5)

Für die Auswertung günstig ist ein Wachstum von ca. 100 Kolonien pro Kulturschale bei der PWM-SCM Kontrolle; dieses wird ungefähr bei einer Aussaat von 4×10^4 Knochenmarkszellen pro ml aus nicht vorbehandelten NMRI-Mäusen (bei einem Gewicht von ca. 25g) erreicht.

3.1.8.3 Standardisierung des Testsystems

Der Gehalt an kolonienstimulierenden der Aktivität in biologischen Flüssigkeiten ist meßbar über Zahl und Größe der in vitro wachsenden Kolonien. Flüssigkeiten mit optimaler CSF-Konzentration ergeben bei log₂ Titration eine sigmoide Wachstumskurve mit einem Plateau im Bereich der maximalen Kapazität bei niederen Verdünnungen (nach Metcalf (83); vgl. Abb.5).

Als in vitro-Positivkontrolle eignen sich CSF-Quellen, welche eine für den verwendeten Typ (hier PWM-

SCM) maximale Kapazität an Kolonienwachstum stimulieren, d.h. bei einer log₂ Titration das obere Plateau der Kurve erreichen (s. Abb. 5). Wird das Plateau nicht erreicht, so kann durch Konzentrieren der

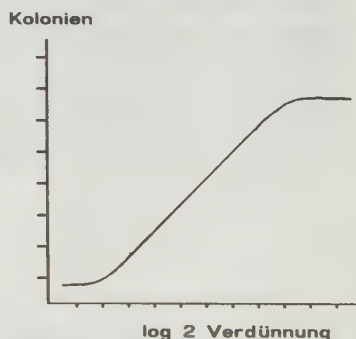


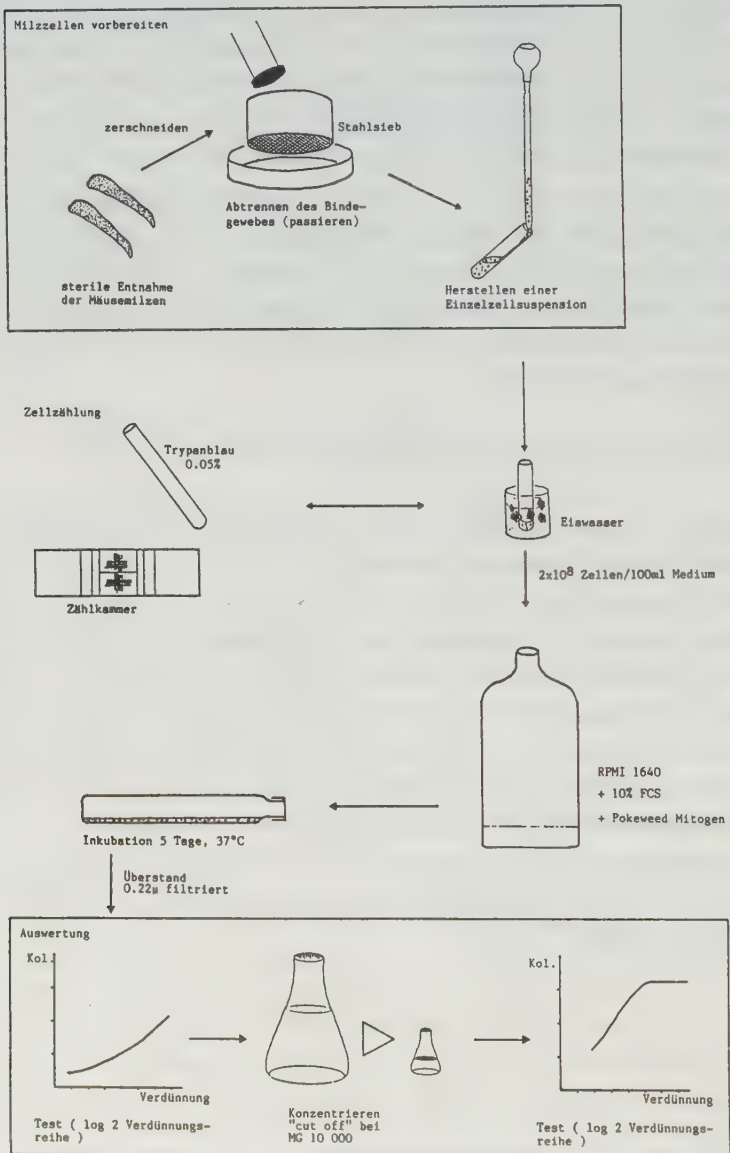
Abb. 5: Idealisierte Kurve für das Kolonienwachstum aus Knochenmarkszellen bei log₂ Titration von Milzzellenkonditioniertem Medium

Flüssigkeit der relative CSF-Gehalt erhöht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diverse Chargen PWM-SCM gepoolt (Ausgangsmenge 3 l) und 12.3-fach konzentriert (s. Ergebnisse). Das Konzentrat wurde mit SCM-Okt85 bezeichnet. Als Standard Positivkontrolle in allen CSA- Serumtesten wurde 20% SCM-Okt85 (1:4 verdünnt mit physiol. NaCl) pro Kulturschale zugegeben. Damit wurde eine Vergleichbarkeit der Einzelteste trotz hoher Variationsbreite in der relativen Zahl kolonienbildender Zellen (CFC) (siehe 3.1.8) bei NMRI-Mäusen erreicht. Zur Analyse der Kolonienzahl pro 5×10^4 Knochenmarkszellen bei der NMRI Maus unter Verwendung der CSF-Quelle SCM-Okt85 wurden die Mittelwerte aller Serum-CSA Teste (n=17) herangezogen. Unter Annahme der Normalverteilung wurde die Standardabweichung berechnet.

3.1.8.4 Einfluß von fetalem Kälberserum (FCS)

Fetale Kälberseren unterschiedlicher Herkunft (verschiedene Firmen oder Chargen) eignen sich verschieden gut für ein Knochenmarkzell-Kolonienwachstum in der Kultur (Dr.L.Hültner, pers. Mitteilung). Zum Nachweis suppressiver oder stimulierender Einflüsse wurden WEHI-3B-konditioniertes Medium (WEHI-3B-CM) mit 20% FCS Zusatz und serumfreies WEHI-3BCM hergestellt (s.o.) und nativ sowie nach Konzentrierung (bis zur Maximalkapazität) auf kolonienstimulierende Aktivität in Zweierverdünnungsreihen getestet. Pro Verdünnungsstufe wurden drei Kulturschalen angesetzt. Verglichen wurden nur Ergebnisse aus Testansätzen mit Knochenmark von ein und derselben Maus bei paralleler Zugabe serumhaltiger und FCS-freier WEHI-3B-CMs.

Abb. 6: Herstellung der *in vitro*-Positivkontrolle (Pokeweed-Mitogen-stimuliertes Milzzellen-konditioniertes Medium



3.1.9 In vivo-Test in der Maus zum Nachweis der Wirksamkeit von PIND-ORF auf die relative Anzahl kolonienbildender Zellen in der Kultur (CFC) aus Knochenmarkzellen

Der Einfluß von PIND-ORF auf die relative CFC-Zahl aus Knochenmarkzellen der Maus wurde mit Hilfe der semisoliden Kulturtechnik untersucht (siehe 3.1.7). Hier wurden jedoch im Unterschied zu den Serum-CSA Testen nicht die Seren vorbehandelter Mäuse *in vitro* geprüft, sondern Mäuse mit PIND- ORF vorbehandelt, deren Knochenmarkzellen gewonnen und anschließend im zuvor beschriebenen Testsystem geprüft. Pro vorbehandelte Maus wurden je drei Kulturschalen mit einheitlicher CSF-Quelle in maximal stimulierender Kapazität (PWM-SCM, Charge 4.10, 20%, 1:2 verdünnt) (vgl. 3.1.8.2) angesetzt.

Insgesamt wurden neun NMRI-Mäuse und drei C57BL/6-Mäuse einen Tag vor der Knochenmarkentnahme mit 0,2ml PIND- ORF 022B intra-peritoneal vorbehandelt. Kontrolltiere wurden mit Placebo vorbehandelt (0.2ml physiol. NaCl-Lösung für NMRI, n=21; 0.2ml RPMI 1640 Zellkulturmedium für C57BL/6, n=3). Aus den Kolonienzahlen der jeweils drei Kulturschalen pro Knochenmarkprobe wurden Mittelwerte gebildet. Aus diesen Mittelwerten wurden für alle Gruppen gleicher Vorbehandlung die Mittelwerte errechnet. Bei beiden NMRI-Vorbehandlungsgruppen wurde (unter Annahme der Normalverteilung) die Standardabweichung berechnet und graphisch dargestellt.

3.2 ERGEBNISSE

3.2.1 Milzzellen-konditionierte Medien

Eine Charge der Pokeweed-Mitogen-stimulierten Milzzellenkonditionierten Medien (PWM-SCM 4.10) erreichte bereits ohne Konzentrieren in der Titration ihre maximale kolonienstimulierende Kapazität (Plateau, s.Abb.5). Diese Charge wurde als CSF- Quelle für die Bestimmung der relativen Zahl kolonienbildender Zellen aus den Knochenmarkzellen der PIND-ORF-vorbehandelten Mäuse verwendet (s. 3.2.8). Alle weiteren Chargen hatten bei den Vortesten submaximale CSF-Konzentrationen. Sie wurden daher gepoolt (ca. 3 l) und durch Ultrafiltration 12.3-fach konzentriert. Das Eluat war frei von nachweisbarer kolonienstimulierender Aktivität. Das Retentat, bezeichnet mit PWM-SCM Okt85, wurde in zwei unabhängigen Testen in Zweierverdünnungsschritten titriert und erreichte dabei maximale Kapazität.

Das Ergebnis ist in Abb. 7 graphisch dargestellt (Mittelwerte).

Bei Stimulation mit unverdünntem PWM-SCM Okt85 konnte ein eindeutig geringeres Wachstum als bei den drei nächsten Verdünnungsstufen festgestellt werden. Zur Klärung dieses unerwarteten Phänomenes wurden Untersuchungen über eventuell supprimierende Einflüsse von FCS unternommen (s.u.).

Aufgrund der ausreichenden Kapazität und der vorhandenen Menge (ausreichend für ca. 1000 Serum-CSA Teste) wurde PWM-SCM Okt85 als in vitro Positivkontrolle für alle Serum-CSA Teste eingesetzt. Die hierbei verwendete Menge pro Testschale betrug 0.2ml einer Verdünnung von 1:4. Bei Mäusen des Stammes NMRI wurde damit die Bildung von 115 ± 33 Kolonien ($n=21$) in der Kultur, bezogen auf 5×10^4 Knochenmarkzellen, stimuliert.

Anzahl der gebildeten
Kolonien aus 5×10^4
Knochenmarkzellen

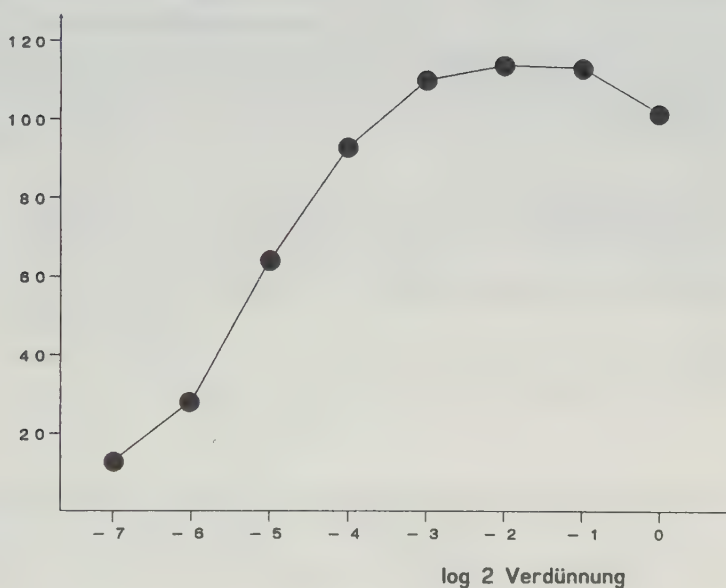


Abb. 7: Kolonienwachstum aus 5×10^4 Knochenmarkzellen nach Stimulation mit Pokeweed-Mitogen-stimulierten Milzzellen-konditioniertem Medium, Charge Okt85

Konditioniertes Medium	Konzentrierung	relative Aktivität
PWM-SCM Okt85 (10% FCS)	12.3 fach	100 %
PWM-SCM 4.10 (10% FCS)	keine	130 %
WEHI-3B-CM (20% FCS)	10 fach	95 %
WEHI-3B-CM (serumfrei)	25 fach	>142 %

Tab. 3.1: Maximale kolonienstimulierende Aktivität unterschiedlich hergestellter konditionierter Medien verglichen mit Pokenweed-Mitogen-stimulierten Milzzellen-konditioniertem Medium der Charge Okt85

3.2.2 Einfluß von fetalem Kälberserum

In vitro hergestellte CSF-Quellen können eine unterschiedliche maximale kolonienstimulierende Aktivität besitzen (siehe Tab. 3.1). Die Verwendung von fetalem Kälberserum ist hierzu von entscheidender Bedeutung. Aus der Abbildung 8 ist zu entnehmen, daß bei Konzentrierung FCS-haltiger und FCS-freier, ansonsten völlig identisch hergestellter WEHI-3B-konditionierter Medien folgende Unterschiede deutlich werden:

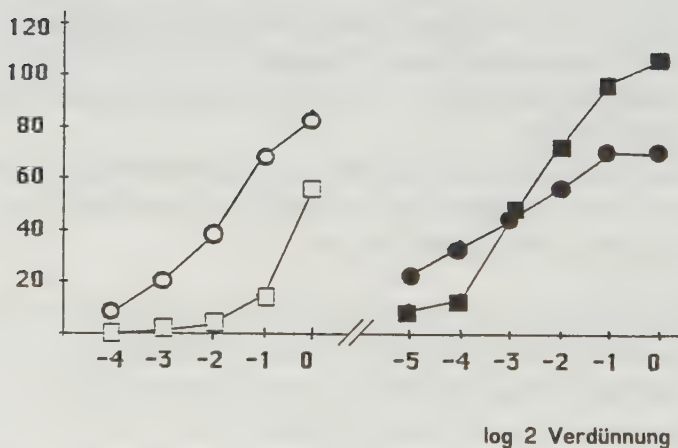
1. Die maximal durch Konzentration erreichbare Kolonienzahl aus 5×10^4 Knochenmarkzellen (Plateau) ist bei FCS-haltigem WEHI-3B-CM niedriger als bei serumfrei produziertem WEHI-3B-CM.
2. Die Steigung der Titrationskurve nach Konzentrierung verringert sich bei FCS-haltigem CM, während sie bei serumfreier Produktion gleich bleibt (siehe Abb. 8).

Die Ergebnisse weisen auf einen konzentrationsabhängigen inhibierenden Einfluß des verwendeten FCS auf die Kolonienbildung hin. Bestätigt wird diese Vermutung ebenfalls dadurch, daß bei FCS-haltigen SCM-Präparationen bei starker Konzentrierung ("cut off" bei MG 10000) relativ niedrigere maximale Kolonienzahlen erreicht werden als bei nicht konzentrierten SCMs.

In der Tabelle 3.1 werden Testergebnisse für vier verschiedene konditionierte Medien miteinander verglichen. Als Bezugspunkt galt dabei PWM-SCM Okt85 mit einer relativen Aktivität von 100.

Abb. 8: Titrationskurven von zwei verschiedenen WEHI-3B-konditionierten Medien vor (im Bild links) und nach (im Bild rechts) der Konzentrierung

Anzahl der gebildeten
Kolonien aus 5×10^4
Knochenmarkzellen



- WEHI-3B-CM ohne FCS
- " mit 20 % FCS
- " ohne FCS, 25-fach konzentriert
- " mit 20 % FCS, 10-fach konzentriert

3.2.3 Kolonienstimulierende Aktivität (CSA) im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Lipopolysaccharid (Positivkontrolle) und Negativkontrollen (Placebo)

3.2.3.1 Placebos

Die kolonienstimulierende Aktivität in Seren nicht vorbehandelter Mäuse des Stammes NMRI lag bei einer Serumverdünnung von 1:6 an der Nachweisgrenze des Testsystems. Bei vier Mäusegruppen wurde eine mittlere CSA von 1.5% ermittelt.

Nach intraperitonealer Vorbehandlung mit physiologischer NaCl-Lösung kam es zu einer geringfügigen Erhöhung des Serum-CSA Gehaltes. Die höchsten Werte wurden 4 und 8 Stunden nach Vorbehandlung mit 3.9% und 3,8% gemessen (jeweils 4 Gruppen). Der BEL-Kulturüberstand (Placebo zum Virusanteil in PIND-ORF) sowie das Lösungsmittel für die Orf Virus-Hüllpräparation stimulierten keine Serum-CSA.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

3.2.3.2 Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid erwies sich in der verwendeten Dosierung (0.5mg pro 30g) als stark toxisch für Mäuse des Stammes NMRI: Im Beobachtungszeitraum bis 8 Stunden nach der Injektion zeigten die Tiere Vergiftungserscheinungen in Form von Anorexie, katarrhalischer bis hämorrhagischer Diarrhoe und katarrhalischer Konjunktivitis. Wie bereits aus der Literatur für diverse Endotoxine bekannt (112; 131), konnte durch LPS bis zu zwölf Stunden nach der Vorbehandlung eine sehr hohe Serum-CSA nachgewiesen werden. In Abb. 9 werden die Serum-CSA Gehalte im zeitlichen Verlauf nach Vorbehandlung mit physiologischer Kochsalzlösung und der "in vitro Positivkontrolle" LPS dargestellt. Im folgenden wird zum Vergleich diese Graphik als Matritze für den Eintrag weiterer Testergebnisse verwendet.

Testpräparat (i.p. Vorbehandlung)	Vorbehand- lungszeit	Zahl der Serumpools (je 3 Mäuse)	Stimulation (100 % = PWM- SCM Okt85)
keines	-	4	1.5 %
0.2ml physiol. NaCl	4h	4	3.9 %
"	8h	4	3.8 %
"	12h	2	2.0 %
"	24h	2	1.9 %
NP40-B-ME (Lösungsm. für Orf-Hüllpräp.)	8h	2	1.6 %
dir. Placebo f.Virus- bestandteil in P.-ORF	4h	1	0.0 %
"	8h	1	0.0 %
"	12h	1	0.0 %

Tab. 3.2: Kolonienstimulierende Aktivität im Serum nicht- bzw. Placebo-vorbehandelter Mäuse, Serumverdünnung 1:6

Kolonienwachstum
in % ¹⁾

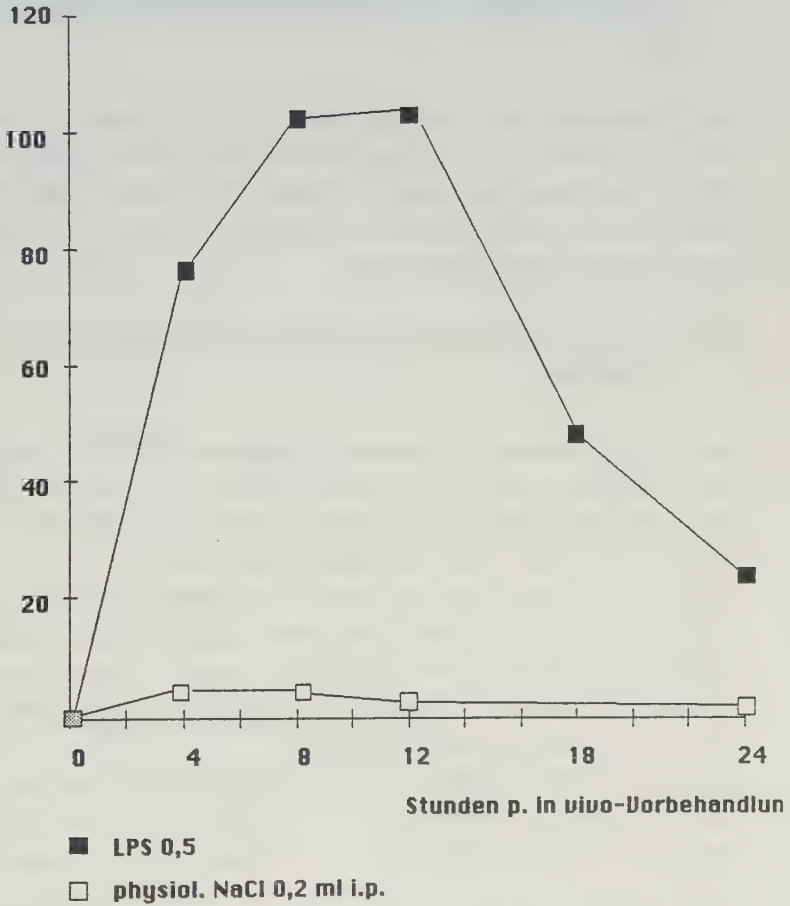


Abb. 9: Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung mit Lipopolysaccharid und Placebo

¹⁾bezogen auf die Standard CSF-Quelle PWM-SCM Okt85 (= 100%)

3.2.4 Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Paramunitätsinducern aus Pockenviren

Nach Behandlung mit PIND-ORF oder PIND-AVI konnte in keinem Fall eine Störung des Allgemeinbefindens der Mäuse festgestellt werden. Nach intraperitonealer Applikation einer hohen Dosis (1.0ml) beider Präparate wurde allerdings eine deutlich weichere Konsistenz des abgesetzten Kotes festgestellt.

3.2.4.1 Kinetik und Dosis-Wirkungsbeziehung beim Einsatz von PIND-ORF

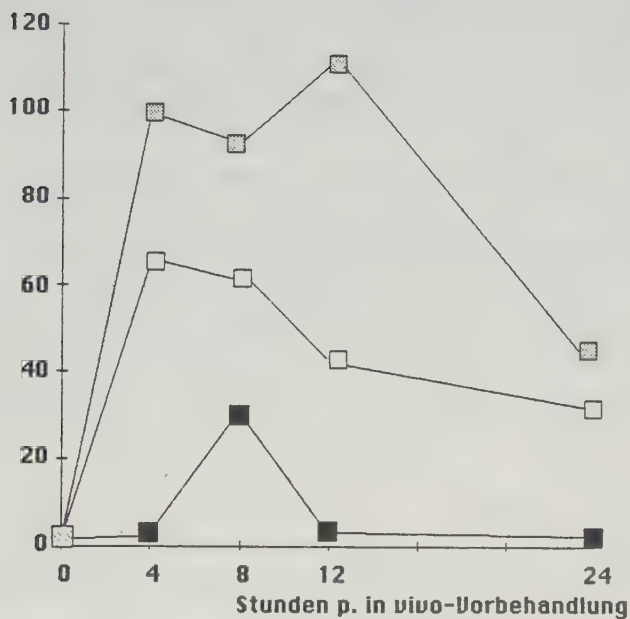
Bei der Untersuchung des Paramunitätsinducers PIND-ORF wurde je eine Charge des chemisch inaktivierten (Charge 022B) und des hitzebehandelten Präparates (Charge 032T) in drei Dosierungen (0.2ml 1:10 verdünnt, 0.2ml und 1.0ml unverdünnt) angewandt.

Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Pro Vorbehandlungszeit und Dosis wurde jeweils ein Serum (drei Tiere) *in vitro* zweimal getestet, bei PIND-ORF 022B in der Dosierung 0.2ml unverdünnt wurden jeweils 3 Seren getestet, aus den Ergebnissen die Mittelwerte berechnet und in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

Der Gehalt an Serum-CSA war bei beiden Chargen positiv mit der eingesetzten Dosis korreliert, in der CSA-stimulierenden Potenz unterschieden sie sich jedoch deutlich. Im Gegensatz zu Charge 022B lag der Effekt von PIND-ORF 032T bei der hohen Dosierung in der Größenordnung der Positivkontrolle LPS; in der niedrigsten Dosierung war bei Charge 032T im Unterschied zu 022B noch eine Wirkung nachweisbar (siehe auch Tab.3.4).

In Abb. 11 wird die im Aujeszky-Virus Belastungsmodell wirksame Dosis von 0.2ml PIND-ORF (i.p.) im Vergleich zu den *in vivo* Kontrollen dargestellt. Der zeitliche Verlauf der Serum-Aktivitäten nach PIND-ORF entspricht dem nach Endotoxin-Vorbehandlung (vgl. Abb.11), das heißt, nach ca 4-12h wird ein Maximum erreicht, danach fällt der Gehalt an CSA rasch ab. Er ist nach 24h aber noch nicht auf die Ausgangswerte abgesunken.

Kolonienwachstum
in % ¹⁾



- PIND-ORF 032T, 0,2 ml 1:10
- PIND-ORF 032T, 0,2 ml unverd.
- ▨ PIND-ORF 032T, 1,0 ml unverd.

Abb. 10: Dosis-Wirkungs Vergleich von PIND-ORF bezüglich kolonienstimulierender Aktivität in Mäuseseren nach intraperitonealer Vorbehandlung

¹⁾ bezogen auf die Standard CSF-Quelle PWM-SCM Okt85 (= 100%)

Kolonienwachstum

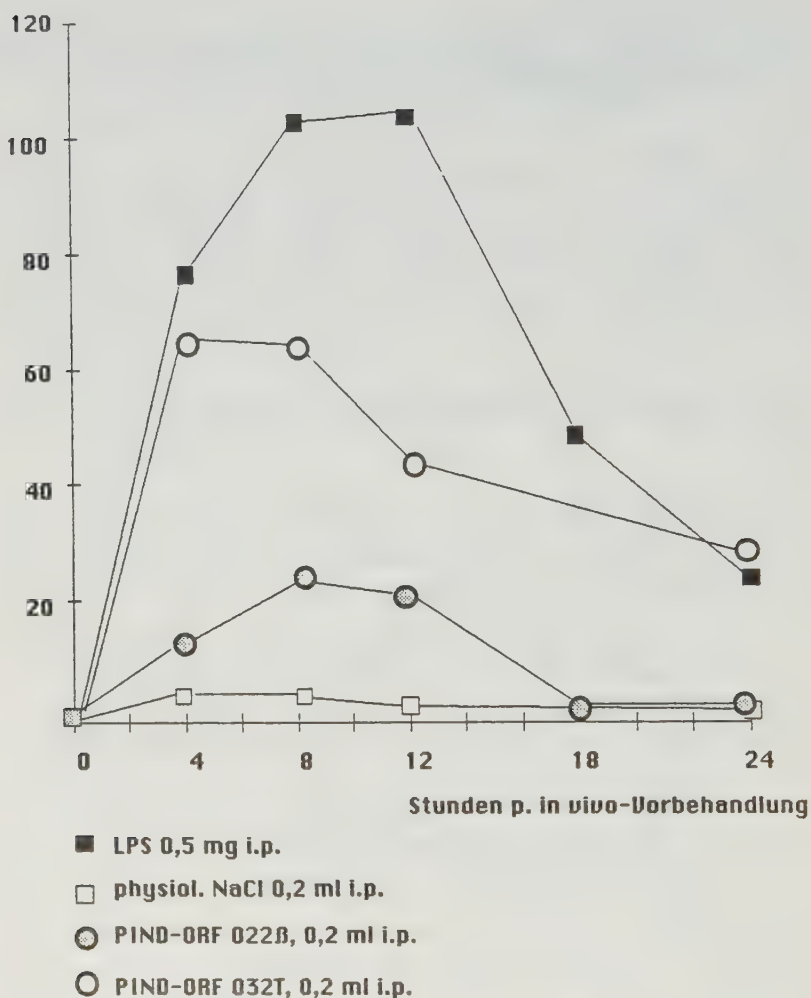
in % ¹⁾

Abb. 11: Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung mit 0.2 ml PIND ORF 032T und 022B im Vergleich zu Lipopolysaccharid und Placebo

¹⁾ bezogen auf die Standard CSF-Quelle PWM-SCM Okt85 (= 100%)

3.2.4.2 Kinetik und Dosis-Wirkungsbeziehung beim Einsatz von PIND-AVI

PIND-AVI, Charge 121, wurde in der Dosierung 0.2ml/30g für die Vorbehandlungszeiten 4, 8 und 12 Stunden an je drei Mäusegruppen, für 18 und 24 Stunden an je zwei Mäusegruppen getestet. Die Stimulationswerte lagen bei dieser Charge im Bereich des Placebo (siehe Abb. 12 u. Tab. 3.4).

Alle weiteren Ergebnisse wurden an je einer Mäusegruppe ermittelt (Mittelwerte aus zwei in vitro Tests).

Charge 131 rief in der Dosierung von 0,2ml pro Maus bereits 4 Stunden nach Vorbehandlung den höchsten CSA-Wert im Serum mit ca. 40% hervor, die Serumaktivität fiel dann bis zur 12-ten Stunde stetig ab, nach 24 Stunden war der Ausgangswert wieder erreicht. Damit wirkte Charge 131 deutlich stärker verglichen mit Charge 121 (siehe Abb. 12); dies korreliert mit den Wirkungs-Indices im Babymaus Belastungstest (VSV-Test)(siehe Tab. 3.3).

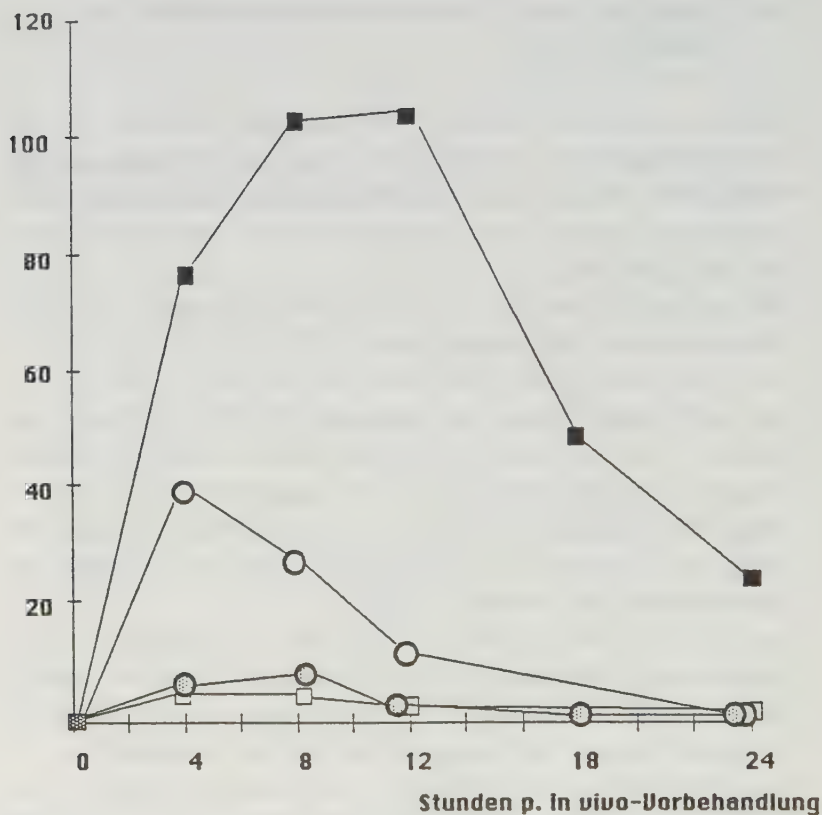
Wie für PIND-ORF wurde für PIND-AVI 121 die Dosis-Wirkungs-Beziehung mit den Dosierungen 1.0ml, 0.2ml und 0.2ml (1:10 verdünnt) pro 30g ermittelt. Eine positive Dosis-Wirkungs-Korrelation konnte festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt.

Die ähnliche Wirkungskinetik aller viralen Paramunitätsinducer erlaubt eine Zusammenstellung der Durchschnittswerte der bei 4, 8 und 12 Stunden nach Vorbehandlung ermittelten Stimulationswerte. Dieser Vergleich verdeutlicht nochmals für alle getesteten Chargen von PIND-ORF und PIND-AVI die

- positive Dosis-Wirkungsbeziehung und die
- unterschiedliche Wirkung einzelner Chargen.

Die Vergleichs-Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Kolonienwachstum in % ¹⁾



- LPS 0,5 mg i.p.
- physiol. NaCl 0,2 ml i.p.
- PIND-AVI Ch 131, 0,2 ml i.p.
- PIND-AVI Ch 121, 0,2 ml i.p.

Abb. 12: Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung mit 0.2 ml PIND AVI 121 bzw. 131 im Vergleich zu Lipopolysaccharid und Placebo

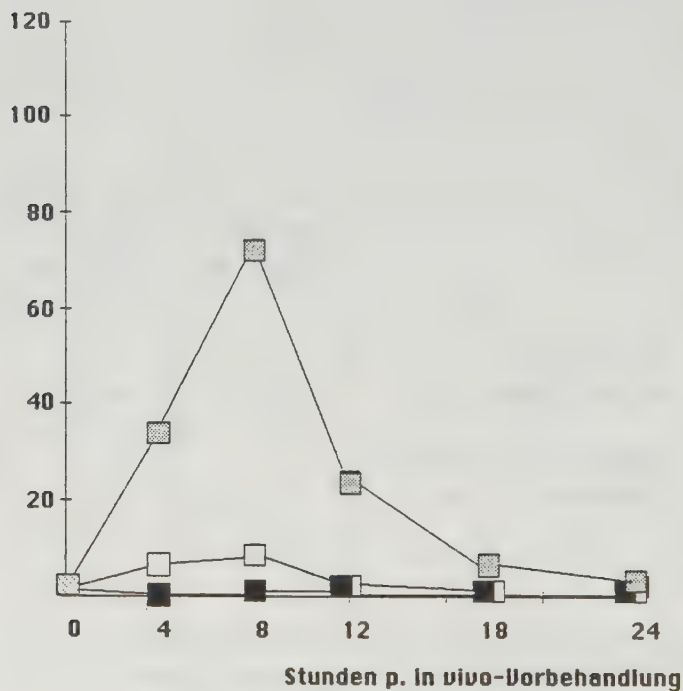
¹⁾ bezogen auf die Standard CSF-Quelle PWM-SCM Okt85 (= 100%)

Test	PIND-AVI Charge 121	PIND-AVI Charge 131
Serum-CSA ¹⁾ (Dosis: 0.2ml/30g, i.p.)	7.0 %	26.2 %
Wirkungsindex im VSV-Test (1:8 verdünnt, 0.1 ml s.c.)	31	75

Tab. 3.3: Vergleich unterschiedlicher Chargen PIND-AVI in bezug auf die Bildung kolonienstimulierender Aktivität im Serum und die Wirkung im Babymaus-Belastungstest

¹⁾ Mittel aus Stimulationswerten zwischen 4h und 12h nach Vorbehandlung, bezogen auf die Standard CSF-Quelle PWM-SCM Okt85 (= 100%)

Kolonienwachstum in % ¹⁾



- PIND-AVI 121, 0,2 ml 1:10
- PIND-AVI 121, 0,2 ml unverd.
- ▨ PIND-AVI 121, 1,0 ml unverd.

Abb. 13: Dosis-Wirkungs Vergleich von PIND-AVI bezüglich kolonienstimulierender Aktivität in Mäuseseren nach intraperitonealer Vorbehandlung

¹⁾ bezogen auf die Standard CSF-Quelle PWM-SCM Okt85 (= 100%)

Testpräparat (i.p. Vorbehandlung)	Vorbehand- lungsdosis	Zahl der Serumpools (je 3 Mäuse)	Stimulation ¹⁾ (100 % = PWM- SCM Okt85)
0.9%-ige NaCl-Lösung	0.2ml	10	3.2 %
Lipopolysaccharid	0.5mg	6	93.7 %
PIND-ORF 032T	1.0ml	3	100.9 %
"	0.2ml	3	57.4 %
" ,1:10 verdünnt	0.2ml	3	12.0 %
PIND-ORF 022B	1.0ml	3	36.5 %
"	0.2ml	8	20.3 %
" ,1:10 verdünnt	0.2ml	3	0.0 %
PIND-AVI 121	1.0ml	3	43.5 %
"	0.2ml	9	7.0 %
" ,1:10 verdünnt	0.2ml	3	0.4 %
PIND-AVI 131	0.2ml	3	26.2 %

Tab. 3.4: Vergleich der Serum-CSA stimulierenden Wirkung unterschiedlicher Chargen und Dosierungen von PIND-ORF und PIND-AVI

¹⁾ Mittel aus Stimulationswerten zwischen 4h und 12h nach Vorbehandlung

3.2.4.3 Kolonienstimulierende Aktivität (CSA) im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit einer gereinigten Virus-Hüllpräparation aus Orf-Virus

Die zur Verfügung stehende Orf-Virus Hüllpräparation wurde in den Dosierungen 2.0µg und 0.2µg Hüllprotein an je drei Mäuse verabreicht. Als Placebo wurde das Lösungsmittel der Proteinpräparation NP40-BME in äquivalenter Menge appliziert. Als Vorbehandlungszeit wurden 8 Stunden gewählt (nach bekannter Kinetik für PIND-ORF). Klinische Reaktionen der Mäuse waren nicht festzustellen. Die kolonienstimulierende Aktivität im Serum betrug -dosisabhängig- 71% und 42% im Vergleich zu PWM- SCM Okt85.

Die Stimulationsraten sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Testpräparat (i.p. Vorbehandlung)	Vorbehand- lungsdosis	Zahl der Serumpools (je 3 Mäuse)	Stimulation (100 % = PWM- SCM Okt85)
NP40- β -ME (Lösungs- mittel für die Orf- Hüllpräparation	0.2ml	2	1.6 %
Orf-Virus Hüll- protein	2.0 μ g	1	71.0 %
"	0.2 μ g	1	41.8 %

Tab. 3.5: Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen 8h nach Vorbehandlung der Tiere mit einer Orf-Virus-Hüllpräparation in zwei Dosierungen

¹⁾ in vitro zweimal getestet, Mittelwerte

3.2.5 Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Aujeszky Virus

Die Vorbehandlung mit Aujeszky Virus erfolgte mit einer in einem standardisierten Aujeszky-Belastungsmodell (79) eingesetzten Dosierung von 2×10^5 KID₅₀ (entspricht 10–50 LD₅₀ bei Mäusen des Stammes NMRI). Bis 18 Stunden nach Vorbehandlung konnte bei acht getesteten Mäusegruppen, ebenso wie bei zwei überlebenden Tieren am fünften Tag, keine erhöhte Serum-CSA gemessen werden. Auch mit der zehnfachen Dosis (2×10^6 KID₅₀) vorbehandelte Mäuse wiesen 8h und 18 h (je zwei Gruppen) nach Virus-Applikation keine über den NaCl-Placebo Effekt hinausgehende Serum-CSA auf.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 aufgelistet.

3.2.6 Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Präparationen bakterieller Herkunft

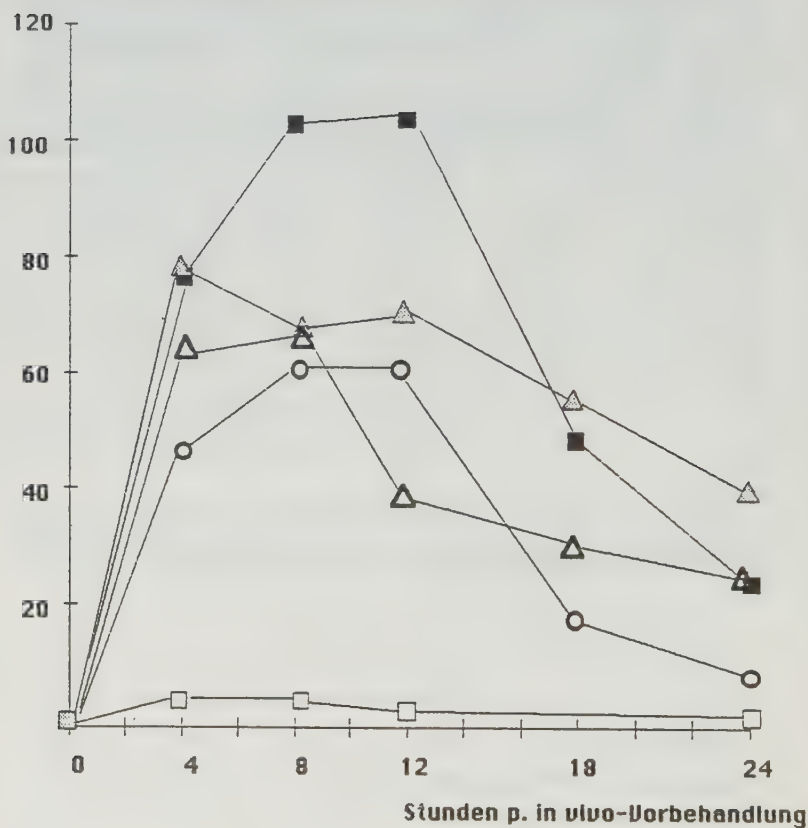
Bei allen Präparaten aus Bakterien wurden in der eingesetzten Dosierung toxische Reaktionen klinisch festgestellt. Am stärksten ausgeprägt war die Reaktion bei Lipopolysaccharid (siehe 3.2.3.2) und bei *Corynebacterium parvum*. Die Mäuse zeigten seröse Konjunktivitis, hämorrhagische Diarrhoe und Anorexie. Nach Applikation von Lysaten aus *E.coli* und *Bordetella bronchiseptica* wurden verminderte Bewegungsaktivität und geringgradige Diarrhoe festgestellt. Die kolonienstimulierende Aktivität nach Behandlung mit den genannten Lysaten bzw. *C. parvum* unterscheidet sich bei der angewandten Dosierung nicht wesentlich: Über einen halben Tag nach Vorbehandlung wurden CSA Werte um ca. 60% (im Vergleich zu PWM-SCM Okt85) nachgewiesen, nach 18h (bei *Bordetella* bereits nach 12h) war ein deutlicher Aktivitätsabfall, der sich fortsetzte, festzustellen. Basale Werte waren 24h nach Vorbehandlung noch nicht erreicht. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 vergleichend zusammen mit Positivkontrolle (LPS) und Placebo (0.9%-ige NaCl-Lösung) dargestellt.

Aujeszky-Virus Titer: 10^8 KID ₅₀ /ml) 0.2ml intraperitoneal	Zeit nach Infektion	Zahl der Serumpools (je 3 Mäuse)	Stimulation (100 % = PWM- SCM Okt85)
Verdünnung ¹⁾ 10^{-1}	8 h	2	1.2 %
" 10^{-1}	18 h	2	4.5 %
" 10^{-2}	4 h	1	1.3 %
" 10^{-2}	8 h	3	2.3 %
" 10^{-2}	12 h	2	0.9 %
" 10^{-2}	18 h	2	0.0 %
" 10^{-2}	5 Tage	1	0.0 %

*Tab. 3.6: Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen
nach Vorbehandlung der Tiere mit Aujeszky Virus*

¹⁾Verdünnung 10^{-2} entspricht 10-50 LD₅₀ beim Stamm NMRI

Kolonienwachstum in % ¹⁾



- physiol. NaCl 0,2 ml i.p.
- LPS 0,5 mg i.p.
- C. parvum 0,7 mg i.p.
- △ E.coli-Lysat 0,2 ml i.p.
- △ B. bronchiseptica-Lysat 0,2 ml i.p.

Abb. 14: Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Präparationen bakterieller Herkunft

¹⁾bezogen auf die Standard CSF-Quelle PWM-SCM Okt85 (= 100%)

3.2.7 Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung der Tiere mit Präparationen aus Pilzen

3.2.7.1 T-2 Toxin

Nach intraperitonealer Applikation von T-2 Toxin traten bei den Mäusen typische Vergiftungserscheinungen (hämorrhagische Diarrhoe, Anorexie, akutes Abdomen) auf. Bei der untersuchten Dosis von 75 g pro Maus (30g) wurde eine maximale kolonienstimulierende Aktivität im Serum nach 12h erreicht. Wie aus Abbildung 15 zu ersehen ist, wurde über 24 Stunden insgesamt etwa ebensoviel CSA im Serum frei wie nach LPS-Vorbehandlung.

3.2.7.2 Candida albicans

Die intraperitoneale Verabreichung dieser pathogenen Hefeart in Dosierungen von 2×10^6 und 1.4×10^7 Zellen pro Maus (30g) verursachte schwere klinische Symptome: gesträubtes Haarkleid, akutes Abdomen, Apathie.

Zwei Tiere wurden drei Tage nach Applikation pathologisch-anatomisch untersucht. Auffällig waren fokale, stecknadelkopfgroße Nekrosen in Niere, Leber und Peritoneum.

Die Kinetik der durch *Candida albicans* induzierten Reaktionen unterschied sich zu allen bisher dargestellten Ergebnissen mit den verschiedenen Testpräparaten; die nach 8h erreichten CSA Werte blieben über 2 Tage auf etwa gleicher Höhe, erst am dritten Tag wurden wieder basale Werte erreicht. Im Vergleich zu PWM-SCM Okt85 stimulierte die Suspension mit 2.0×10^6 Hefezellen CSA Werte von ca. 20% und die Suspension mit 1.4×10^7 Hefezellen CSA Werte von ca. 45%, das heißt, die induzierte Serumaktivität war eindeutig dosisabhängig. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 16 dargestellt.

Kolonienwachstum in % ¹⁾

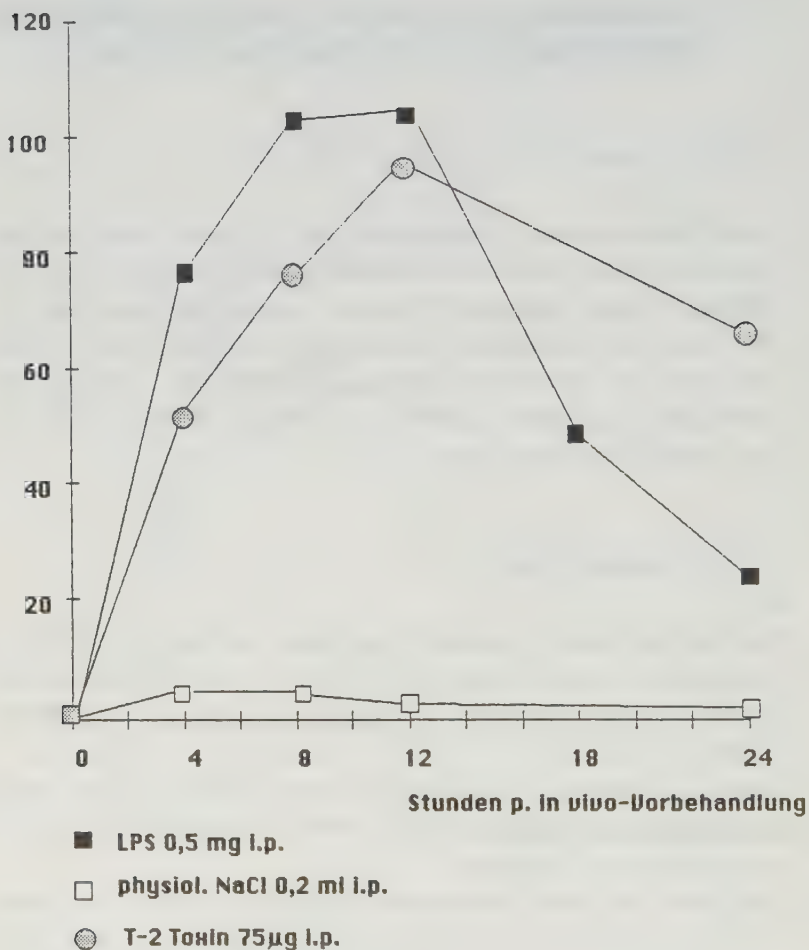


Abb. 15: Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach Vorbehandlung (i.p.) mit T-2 Toxin im Vergleich mit Lipopolysaccharid und Placebo

¹⁾bezogen auf die Standard CSF-Quelle PWM-SCM Okt85 (= 100%)

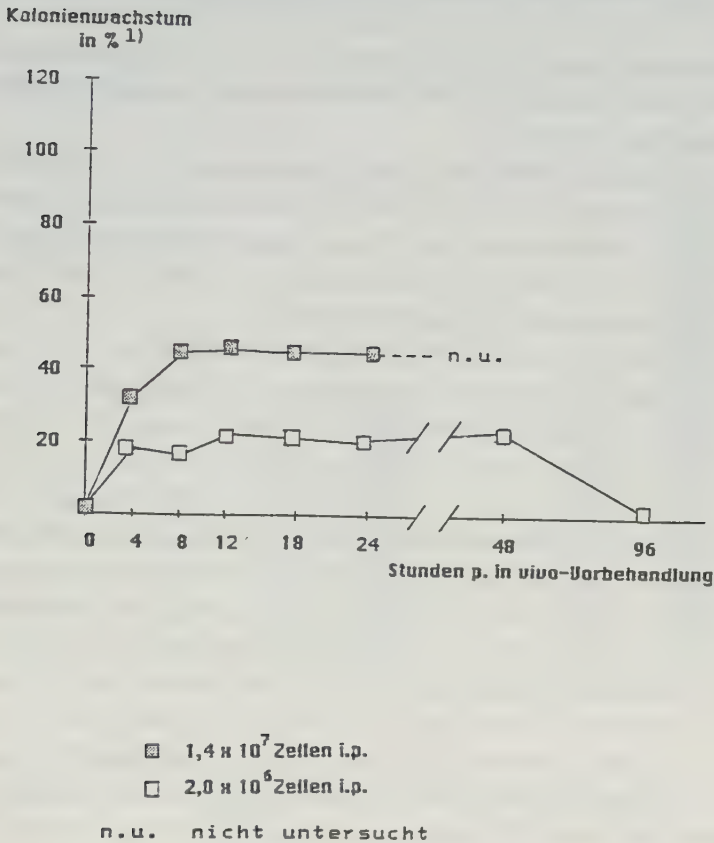


Abb. 16: Kolonienstimulierende Aktivität im Serum von Mäusen nach intraperitonealer Verabreichung von *Candida albicans* in unterschiedlicher Zellzahl

¹⁾bezogen auf die Standard CSF-Quelle PWM-SCM Okt85 (= 100%)

3.2.8 Änderung der relativen Zahl kolonienbildender Zellen (CFC) im Knochenmark von Mäusen nach Vorbehandlung mit PIND-ORF

Die Untersuchungen über die Änderung der Anzahl kolonienbildender Zellen im Knochenmark der Maus nach in vivo-Vorbehandlung führten zu folgendem Ergebnis:

Mäuse der Stämme NMRI und C57BL/6 wiesen einen Tag nach Vorbehandlung mit PIND-ORF (Charge 020B) im Knochenmark einen tendenziell relativ erhöhten Anteil an CFC im Vergleich zu den Kontrolltieren (Placebo) auf. Beim Stamm C57BL/6 wurde als Placebo RPMI 1640 Kulturmedium (0.2ml) verwendet (3 Tiere).

Bei NMRI-Mäusen wurde als Kontrolle der Mittelwert der CFC von 21 mit physiol. NaCl-Lösung vorbehandelten Mäusen eingesetzt. Die Vorbehandlung mit PIND-ORF erfolgte in einer Dosierung von 0.2 ml pro Maus (i.p.) (bei NMRI 8 Mäuse, bei C57BL/6 3 Mäuse).

Für die CFC-Teste wurde als CSF-Quelle PWM-SCM 4.10 bei maximal stimulierender Konzentration (0.1ml pro Kulturschale; Titration nicht dargestellt) eingesetzt. Im einzelnen wurden bei Mäusen des Stammes NMRI nach Placebo 54 (± 21) und nach Vorbehandlung mit PIND-ORF 81 (± 28) Kolonien aus 2.5×10^4 Knochenmarkzellen gezählt. Die relativ hohe Standardabweichung entspricht auch dem Ergebnis aus 3.2.1, wobei dort PWM-SCM Okt85 als CSF-Quelle verwendet wurde.

Bei Mäusen des Stammes C57BL/6 war die durchschnittliche CFC-Zahl nach PIND-ORF im Vergleich zu Placebo-vorbehandelten Mäusen (je 3 Tiere) von 90 auf 152 Kolonien pro 2.5×10^4 Knochenmarkzellen erhöht.

Die Ergebnisse werden in Abbildung 17 als Mittelwerte und Standardabweichung (NMRI) bzw. Einzelergebnisse (C57BL/6) dargestellt.

Anzahl der kolonienbil-
denden Zellen aus 2.5×10^4
Knochenmarkzellen*)

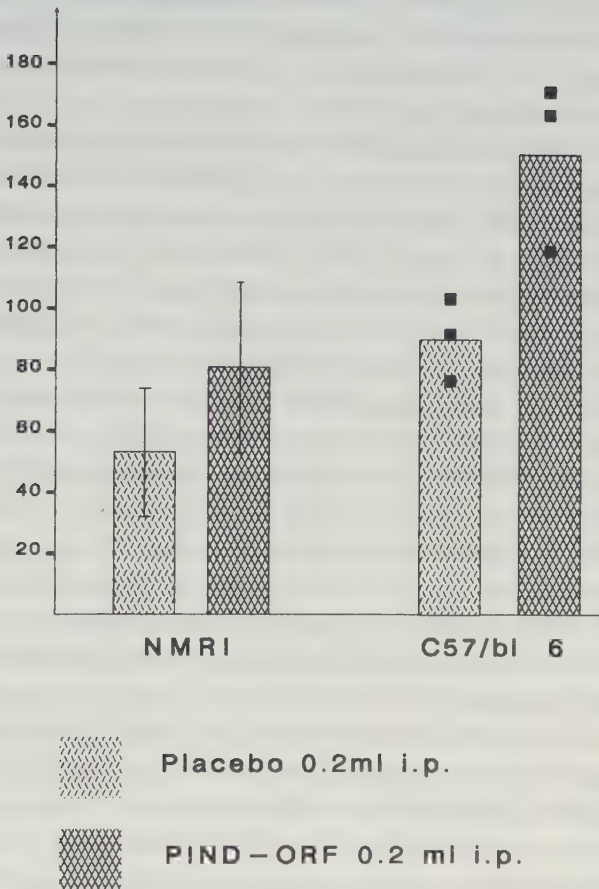


Abb. 17: Relative Anzahl kolonienbildender Zellen (CFC) im Knochenmark von Mäusen 24 Stunden nach Vorbehandlung mit PIND-ORF oder Placebo

*) CSF-Quelle: PWM-SCM Charge 4.10, 0.1ml pro Kulturschale

3.4 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Kolonienstimulierende Faktoren haben essentielle Funktionen im Immunsystem und im hämatopoetischen System. Der therapeutische Einsatz wird jedoch zum einen durch die extrem kurze Serum-Halbwertszeit exogen zugeführter CSFs limitiert (hu-GM-CSF: 7 min in der Anfangsphase, dann 80-90 min (33)). Andererseits sind nur für Mensch und Maus homologe CSFs in reiner Form für wissenschaftliche und therapeutische Anwendungen verfügbar. Eine heterologe Wirksamkeit ist bei diesen Spezies nur begrenzt gegeben (87), für weitere Spezies ist hierzu nichts bekannt. Die Tiermedizin ist damit, nicht nur aus finanziellen Gründen, weit von der Anwendung reiner Faktoren bei Heim- und Nutztieren entfernt.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, können jedoch durch eine Reihe nicht toxischer ebenso wie bekannterweise (s. Tab. 2.3) durch toxische Präparate in der Maus hohe Serum-CSA Werte induziert werden.

In der vergangenen Zeit wurde das Augenmerk bei den kolonienstimulierenden Faktoren vornehmlich auf hämatopoetische Ereignisse gerichtet, als Induktoren wurden in vivo standardisierte Endotoxine oder toxische Präparationen (Mitogene, pathogene Mikroorganismen) zur "Produktion" von CSF verwendet. Lediglich Schlick et al. (122) verwenden CSF-induzierende Biological Response Modifier (BRM) zur Ausdifferenzierung einer in der Maus mit WEHI-3B D+ artifiziell erzeugten Leukämie. Weitere Untersuchungen mit Inducern zum gezielten therapeutischen Einsatz als CSF-Induktoren fehlen.

In vitro Effekte von rein dargestellten CSFs (s. Kap. 2.3) lassen eine bis vor kurzem ungeahnte Bedeutung bei der funktionellen Aktivierung des Abwehrsystems vermuten. Hieraus läßt sich ein Bedarf an solchen Faktoren für folgende Indikationsbereiche schließen:

- hereditäre oder iatrogene Cytopenien
- Leukämien

- Krebstherapie via Stimulation zytotoxischer Mechanismen
- Immunschwächen
- Begleittherapie zu Immunsuppressiva
- unterstützende Behandlung von Infektionskrankheiten
- prophylaktische Immunstimulation (Paramunisierung)

Mit den in der Tiermedizin verwendeten Paramunitätsinducern aus Pockenviren, PIND-AVI und PIND-ORF, stehen praxisbewährte Präparate zur Verfügung, welche, wie am Modell der Maus gezeigt wurde, dosisabhängig Serum-CSA induzieren.

Diese Eigenschaft bietet neben bisher in vitro nachgewiesenen Wirkungsmechanismen (Aktivierung von NK-Zellen (ex vivo), Stimulierung von Lymphozyten im Lymphozytentransformationstest, Bildung von Seruminterferon nach PIND-ORF-Applikation) eine mögliche Erklärung für die Wirkung der Inducer aus Pockenviren in standardisierten Infektionsbelastungsmodellen (79), nämlich eine durch kolonienstimulierende Faktoren vermittelte Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen.

In diesem Zusammenhang scheint das Ergebnis mit dem im Belastungsmodell der adulten Maus eingesetzten Aujeszky-Virus in bezug auf CSA besonders interessant zu sein: Ohne Vorbehandlung führt diese Herpes-Infektion zum Tode, durch Vorbehandlung mit den CSA-induzierenden Inducern PIND-ORF, PIND-AVI oder C.parvum können die Tiere geschützt werden (79). Der Nachweis, daß es nach Infektion mit Aujeszky-Virus ohne Inducer-Vorbehandlung zu keinem Anstieg der Serum-CSA kommt, stellt damit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese bei Herpesinfektionen dar. Neuere Untersuchungen beim Schwein über die Affinität des Aujeszkyvirus zu Knochenmarkzellen, speziell zu den dort reifenden NK-Zellen (53), werfen generell die Frage auf, wie pathogene Mikroorganismen, die sich bevorzugt in Zellen des Abwehrsystems vermehren, auch Einfluß auf die Mediator-Ausschüttung bzw. Synthese haben. Der im Lympho-

zyten-Proliferationstest erbrachte Nachweis von supprimierender Aktivität in Kulturüberständen von Lymphozyten, welche mit bovinem Herpesvirus (Typ 1) infiziert waren, mißt in diesem Zusammenhang Suppressor-Faktoren, welche bisher nicht näher charakterisiert sind, eine Bedeutung zu (76a).

Für eine Korrelation zwischen paramunisierender Eigenschaft und Serum CSA spricht der erzielte Wirkungsindex im VSV-Test und die Quantität einer Serum CSA-Induktion bei den beiden untersuchten Chargen von PIND-AVI (s.Tab.3.3).

Als Vertreter der Inducer aus gramnegativen Bakterien wurden neben Lipopolysaccharid (aus *Salmonella typhimurium*) Lysate aus *E. coli* und *Bordetella bronchiseptica* untersucht. Diese Lysate sind einfach herstellbar und in bakteriellen Belastungsmodellen bei der Maus gut wirksam (3). Die Lipopolysaccharid-Bestandteile (Lipid A) aus der Bakterienhülle werden für die immunologische wie für die toxische Wirkung verantwortlich gemacht (34;131).

In der verwendeten Verdünnung ist die immunologische Wirksamkeit sowohl in bezug auf Serum-CSA Bildung als auch in Belastungsmodellen gegeben, während bei der Applikation unverdünnter Lysate die toxische Wirkung im Vordergrund steht (3; Dr. G.Baljer, pers. Mitteilung). LPS war erwartungsgemäß stark toxisch und ein starker Serum-CSA Induktor (121;131).

Auch *C. parvum*, ein klassischer Inducer mit guter Wirksamkeit in Infektions- wie Tumorbelastrungsmodellen (79), führte zu einer Erhöhung der Serum-CSA. Dieses Ergebnis bestätigt Ergebnisse aus früheren Untersuchungen (37).

T2-Toxin erzeugte eine sehr hohe Serum-CSA. Da dieses Mykotoxin durch Blockade an den Polyribosomen die Proteinbiosynthese hemmt (25), kann davon ausgegangen werden, daß gestapelte CSFs freigesetzt bzw. aktiviert wurden. Die bei allen bisher besprochenen Substanzen ermittelte zeitliche Kinetik der Serum CSA Spiegel entspricht in etwa der nach T2-Toxin. Dies spricht generell für die Annahme, daß

eine de novo Synthese der Faktoren nach Stimulation nicht notwendig ist. Anders verhielt sich die Kinetik nach Applikation vermehrungsfähiger, pathogener Hefezellen: Über zwei Tage wurden beachtliche CSA-Werte gemessen. Das Auftreten von Serum-CSA konnte nicht überraschen, da bereits früher durch Wandbestandteile von Hefezellen (Zymosan) in vitro bei Makrophagen eine CSA-Freisetzung beschrieben wurde (69). Die Dauer der dosisabhängigen CSA-Werte kann durch die länger anhaltende Präsenz von stimulierenden Bestandteilen infolge der Vermehrung der Hefen in vivo erklärt werden.

Die hohen Schwankungen in der relativen Zahl kolonienbildender Zellen bei ein und der selben, standardisierten CSF-Quelle lassen sich erklären durch den Einfluß von Veränderungen des Keimmilieus bei konventioneller Haltung sowie durch natürliche Rhythmen. So ist die relative Anzahl an CFC im Knochenmark der Maus in den Sommermonaten höher als in den Wintermonaten, tageszeitlich bedingte Schwankungen sind je nach Jahreszeit unterschiedlich ausgeprägt mit Maxima am Tag und einem Minimum ca. 3h nach Beginn der Dunkelheit (1). Bei Standardisierung auf eine einheitliche CSF-Quelle spielen diese Schwankungen jedoch in bezug auf die Messung relativer CSA-Gehalte in biologischen Flüssigkeiten keine Rolle, sie erschweren jedoch die Untersuchung auf systematische Veränderungen in der CFC-Zahl nach Vorbehandlung in vivo. Deshalb wurden nur exemplarisch für PIND-ORF diesbezügliche Untersuchungen unternommen. Dabei wurde einen Tag nach der Vorbehandlung nur eine tendentiell höhere CFC-Zahl gemessen. Auch bei Applikation von reinen CSF-Präparationen wurde eine geringgradige Erhöhung der Leukozytenzahlen nach 24h beobachtet, wobei sich der Nachweis von Knochenmarkzellen im Mitose-Zyklus hier als wesentlich sensitiver erwies (88). Andere Autoren beschreiben ebenfalls eine Erhöhung der CFC Zahl im Knochenmark nach Applikation von Inducern (*Corynebacterium parvum*, *Lactobacillus casei* (10); Azimexone, MVE, BM 41.332 (121)).

Die Ergebnisse aus den beiden Testsystemen sind insofern vergleichbar, als zum einen die Serum-CSA in vitro und zum anderen eine in vivo-Konsequenz kolonienstimulierender Faktoren, nämlich die erhöhte Zahl kolonienbildender Zellen des Knochenmarks, gemessen wird. Der kausale Zusammenhang zwischen den beiden Parametern (88) wurde mit den vorliegenden Ergebnissen für PIND-ORF in beiden Testsystemen bestätigt.

Gegenüber dem Serum-CSA Nachweis hat der Test zur Bestimmung der relativen CFC-Zahl jedoch entscheidende Nachteile:

1. Die vergleichsweise relativ geringen Effekte und die hohe natürliche Streubreite erfordern eine hohe Zahl von Probanden.
2. Die nach der Vorbehandlung notwendige Entnahme von Knochenmark beschränkt die Anwendung aus praktischen Gründen auf kleine Versuchstiere.
3. Die Lagerung des Probenmaterials (Knochenmarkzellen) ist nicht praktikabel (Seren für die CSA-Teste sind einfach zu lagern).

Somit ist der gut standardisierbare Serum-CSA Test im Vergleich zur Bestimmung der Änderung der CFC-Zahl wesentlich eleganter. Vor allem ist eine Anwendung bei Heim- und Nutztieren, der Zielgruppe der Inducer für die Tiermedizin, bei entsprechender Standardisierung gut denkbar.

Hier steht also ein praktikabler Test zur Verfügung, der einerseits sensibel die Wirksamkeit von Immunstimulantien dokumentiert und andererseits keine Belastung für den Probanden darstellt.

Es bleibt zu wünschen, daß durch den Serum-CSA Test ein entscheidender Schritt weg von den bisher notwendigen Challenge- Versuchen und hin zu feinen, tierschützgerechten Methoden zur Prüfung von Immunstimulantien an unterschiedlichen Tierarten getan wurde.

5. Zusammenfassung

Seren von vorbehandelten Mäusen des Auszuchtstammes NMRI wurden auf ihre kolonienstimulierende Aktivität (CSA) bei Anwendung einer speziellen Zellkulturtechnik mit semisolidem Medium an syngenen Knochenmarkzellen untersucht. Ein suppressiver Einfluß von konzentriertem fetalen Kälberserum *in vitro* auf das klonale Wachstum von Mäuseknochenmarkzellen wurde nachgewiesen.

Die Standardisierung des Testsystems erfolgte durch konditioniertes Medium von Pokeweed-Mitogen-stimulierten Milzzellen. Damit steht ein praktikabler Serum-Zellkulturtest zur Verfügung, der am Modell der Maus etabliert wurde und sich analog auf andere Tierspezies, speziell Nutztiere, übertragen läßt.

Erstmals wurde nachgewiesen, daß sich CSA experimentell auch durch virale Inducer stimulieren läßt.

Nach Applikation von grobgereinigten Paramunitätsinducern aus Pockenviren (PIND-AVI, PIND-ORF) konnten mit steigender Vorbehandlungsdosis zunehmende Serum-CSA Werte ebenso wie nach Gabe von Lipopolysaccharid (aus *Salmonella typhimurium*) oder T-2 Toxin (natürlicherweise in Fusarien vorkommend, Proteinbiosynthese-Hemmung) gemessen werden.

Inducerpräparationen aus Bakterien (*C. parvum*, *B. bronchiseptica*, *E. coli*) und pathogene Hefen führten ebenfalls zu hoher Serum-CSA. Nach Vorbehandlung mit mäuseletalen Dosen von Aujeszky Virus konnte kein erhöhter Gehalt an CSA im Serum beobachtet werden.

Ein zweiter Test für vergleichende Untersuchungen in bezug auf die Änderung der relativen Anzahl kolonienbildender Zellen (CFC) aus dem Knochenmark vorbehandelter Mäuse erwies sich als weniger gut geeignet und läßt sich beim Nutztier praktisch nicht anwenden.

Von allen untersuchten Substanzen waren lediglich die Pockenpräparate gut verträglich.

Summary

COLONY-STIMULATING ACTIVITY IN SERA OF MICE AFTER PRE-TREATMENT WITH IMMUNOSTIMULANTS TAKEN FROM POX-VIRUSES AND OTHER MICROORGANISMS

The sera of pretreated mice (NMRI) were tested for their colony-stimulating activity (CSA) by applying a special cellculture technique to syngeneic bone-marrow cells. Concentrated fetal calf serum showed an inhibitory influence in vitro on the clonal growth of bone marrow-derived colony-forming cells of mice.

The test was standardized by Pokeweed-Mitogen-stimulated spleen cell conditioned medium (PWM-SCM). Therefore we have established a useful serum-cellculture assay in a mouse-model, which is transferable to other species, especially farm animals.

It was demonstrated for the first time that serum-CSA can be experimentally induced by virus-derived immunostimulants. Dose-dependant serum-CSA levels were found after the application of crude immunostimulants (paramunity-inducers) taken from Pox viruses (PIND-AVI, PIND-ORF) as well as after applying Lipopolysaccharid (S. typhimurium) or T-2 toxin, which occurs naturally in fusaria spp. and is an inhibitor of proteinbiosynthesis. The use of bacterial inducers (C. parvum, B. bronchiseptica, E. coli) and infection with pathogen Candida also resulted in high serum-CSA.

Infection with mice-lethal dosages of Aujeszky virus does not increase serum-CSA levels.

Another assay for comparative studies on the relative counts of colony-forming cells in the bone marrow of mice seemed to be less suitable and can not be used on farm animals in practice.

Of all the substances evaluated only inducers taken from Poxviruses were well tolerated.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Aardal, N.P., 1984:
Circannual Variations of Circadian Periodicity in Murine Colony-Forming Cells
Exp. Hematol. 12,61
- 2 Abramson, S., R.G. Miller, R.A. Phillips, 1977:
The Identification in Adult Bone Marrow of the Pluripotent and Restricted Stem Cells of the Myeloid and Lymphoid Systems
J. Exp. Med. 145,1567
- 3 Adler, J., 1985:
Experimentelle Untersuchungen über die paramunisierenden Eigenschaften von Bakterienlysaten in bakteriellen Infektionsmodellen bei der Maus
Vet. Med. Diss., München
- 4 Ampel, N.M., E.J. Wing, A. Waheed, R.K. Shadduck, 1986:
Stimulatory Effects of Purified Macrophage Colony-Stimulating Factor on Murine Resident Peritoneal Macrophages
Cell. Immunol. 97,344
- 5 Apte, R.N., D.H. Plutznik, 1976:
Genetic Control of Lipopolysaccharide Induced Generation of Serum Colony Stimulating Factor and Proliferation of Splenic Granulocyte/Macrophage Precursor Cells
J. Cell. Physiol. 89,313
- 6 Barr, R.D., J. Wang-Peng, S. Perry, 1975:
Hemopoietic stem cells in human peripheral blood
Science 190,284
- 7 Bazill, G.W., M. Haynes, J. Garland, T.M. Dexter, 1983:
Characterization and partial purification of a haemopoietic cell growth factor in WEHI-3 cell conditioned medium
Biochem. J. 210,747
- 8 Böhme, D.H., H.A. Schneider, J.M. Lee, 1959:
Some physiopathological parameters of natural resistance to infection in murine salmonellosis
J. Exp. Med. 110,9
- 9 Bradley, T.R., D. Metcalf, 1966:
The Growth of Mouse Bone Marrow Cells In Vitro
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44,287
- 10 Broxmeyer, H.E., D.E. Williams, H.S. Boswell, S. Cooper, R.K. Shadduck, S. Gillis, A. Waheed, D.L. Urdal, 1986:
The Effects In Vivo of Purified Preparations of Murine Macrophage Colony Stimulating Factor-1, Recombinant Murine Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor and Natural and Recombinant Murine Interleukin 3 without and with Pretreatment of Mice with Purified Iron-Saturated Human Lactoferrin
Immunobiol. 172,168

- 11 Buddle, B.M., R.W. Dellers, G.G. Schurig, 1984:
Heterogeneity of contagious ecthyma virus isolates
Am. J. Vet. Res. 45,75
- 12 Büttner, M., A. Mayr, 1986:
Tests on Protection Against Viral Diseases
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 9(2):im Druck
- 13 Burgess, A., 1985:
Growth factors and oncogenes
Immunol. Today 6(3),107
- 14 Burgess, A., D. Metcalf, S.H.M. Russel, N.N. Nicola, 1980:
Granulocyte/Macrophage-, Megakaryocyte-, Eosinophil- and
Erythroid-Colony-Stimulating Factors Produced by Mouse
Spleen Cells
Biochem. J. 185,301
- 15 Burns, G.F., C.G. Begley, I.R. Mackay, T. Triglia, J.A. Werkmeister, 1985:
'Supernatural' killer cells
Immunol. Today 6(12),370
- 16 Cambier, J.C., 1986:
Seeing the way to B-cell growth.
Nature 319,620
- 17 Campbell, H.D., S. Ymer, M.C. Fung, I.G. Joung, 1985:
Cloning and nucleotide sequence of the murine interleukin-3
gene
Europ. J. Biochem. 150,297
- 18 Cantrell, M.A., D. Anderson, D.P. Cerretti, V. Price, K. McKerghan,
R.J. Tushinski, D.Y. Mochizuki, A. Larsen, K. Grabstein, S. Gillis,
D. Cosman, 1985:
Cloning, sequence and expression of a human granulocyte/
macrophage colony-stimulating factor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,6250
- 19 Cerny, J., 1974:
Stimulation or bone marrow haemopoietic stem cells by a
factor from activated T cells
Nature 249,63
- 20 Chen, B.D.-M., 1986:
Interferon Induced Inhibition of Receptor-Mediated Endo-
cytosis of Colony-Stimulating Factor (CSF-1) by Murine
Peritoneal Exudate Macrophages
J. Immunol. 136(1),174
- 21 Chevernick, P., A. Boggs, 1970:
Bone Marrow Colonies: Stimulation In Vitro by Supernatant
from Incubated Human Blood Cells
Science 169,691
- 22 Chirigos, M.A., E. Schlick, T. Saito, E. Gruys, 1986:
Biological Response Modifiers: Regulators of the Cellular
Immune System and Adjuvants in Antitumor Therapy
Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol. 8(1),27

- 23 Clark-Lewis, I., R. Aebbersold, H. Ziltener, J. W. Schrader, L. E. Hood, S. B. H. Kent, 1986:
Automated Chemical Synthesis of a Protein Growth Factor for Haemopoietic Cells, Interleukin-3
Science 231,134
- 24 Clark-Lewis, I., S. B. H. Kent, J. W. Schrader, 1984:
Purification to Apparent Homogeneity of a Factor Stimulating the Growth of Multiple Lineages of Hemopoietic Cells
J. biol. Chem. 259,7488
- 25 Cole, R. J., R. H. Cox, 1981:
Handbook of Toxic Fungal Metabolites
Academic Press, London
- 26 Conlon, P. J., K. H. Luk, L. S. Park, C. J. March, T. P. Hopp, D. L. Urdal, 1985:
Generation of anti-peptide monoclonal antibodies which recognize mature CSF-2 (IL 3) protein
J. Immunol. 135,328
- 27 Crapper, R. M., J. W. Schrader, 1986:
Evidence for in vivo production and release into the serum of a T-cell lymphokine, persisting-cell stimulating factor (PSF), during-graft-versus host reactions
Immunology 57,553
- 28 Decker, T., M. Baccarini, M.-L. Lohmann-Matthes, 1986:
Liver-associated macrophage precursors as natural cytotoxic effectors against *Candida albicans* and Yac-1 cells
Europ. J. Immunol. 16,693
- 29 Degliantoni, G., M. Murphy, M. Kobayashi, M. K. Francis, B. Perussia, G. Trinchieri, 1985:
Natural Killer (NK) Cell Derived Hematopoietic Colony-Inhibiting activity and NK Cytotoxic Factor
J. Exp. Med. 162,1512
- 30 Dexter, M., 1986:
Growth factors: From the laboratory to the clinic.
Nature 321,198
- 31 Dimitrov, N. V., S. Andre, G. Eliopoulos, B. Halpern, 1975:
Effect of *Corynebacterium Parvum* on Bone Marrow Cell Cultures
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148,440
- 32 Djeu, J. Y., E. Lanza, S. Pastore, A. J. Hapel, 1983:
Selective growth of natural cytotoxic but not natural killer effector cells in interleukin 3
Nature 306,788
- 33 Donahue, R. E., E. A. Wang, D. K. Stone, R. Kamen, G. G. Wong, P. K. Seghal, D. G. Nathan, S. C. Clark, 1986:
Stimulation of haemopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF
Nature 321,872

- 34 Eichelberg,D., W.Schmutzler, 1983:
Pharmakologische Aspekte der Immunstimulanzen
Immun. Infekt. 11,109
- 35 Ezekowitz,R.A.B., 1985:
The role of growth factors and interferons in the induction
of activated murine macrophages from bone marrow pre-
cursors
Immunol. Letters 11,135
- 36 Fleischmann,J., D.W.Golde, R.H.Weisbart, J.C.Gasson, 1986:
Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Enhances Phagocytosis of Bacteria by Human Neutrophils
Blood 68(3),708
- 37 Foster,R.S., B.McPherson, D.A.Browdie, 1977:
Effect of *Corynebacterium parvum* on colony stimulating
factor and granulocyte-macrophage colony formation
Cancer Res. 37,1349
- 38 Fung,M.C., A.J.Hapel, S.Ymer, D.R.Cohen, R.M.Johnson, H.D.Camp-
bell, I.G.Young, 1984:
Molecular cloning of cDNA for murine interleukin-3
Nature 307,233
- 39 Galelli,A. L.Chedid, 1983:
Modulation of Myelopoiesis In Vivo by Synthetic Adjuvant-
Active Muramyl Peptides: Induction of Colony-Stimulating
Activity and Stimulation of Stem Cell Proliferation
Infect. Immun. 42,1081
- 40 Galelli,A., P.Lefrancier, L.Chedid, 1984:
Colony-Stimulating Activity Induced by Synthetic Muramyl
Peptides: Variation with Chemical Structure and Association
with Anti-Infectious Activity
Infect. Immun. 46,495
- 41 Garland,J.M. 1986:
Growth, receptors and interleukin 3
Immunol. Today 7(4),104
- 42 Gasson,J.C., D.W.Golde, S.E.Kaufman, C.A.Westbrook, R.M.Hewick,
R.J.Kaufmann, G.G.Wong, P.A.Telple, A.C.Leary, E.L.Brown,
E.C.Orr, S.C.Clark, 1985:
Molecular characterization and expression of the gene encod-
ing human erythroid-potentiating activity
Nature 315,768
- 43 Gautam,S.C., K.Beckman, J.R.Batisto, 1986:
Natural Cytotoxic T Cells (NCTC) that differ from Natural
Killer (NK) and natural Cytotoxic (NC) Cells are present in
Peyer's Patches of Mice
Cell. Immunol. 101,463

- 44 Gearing, A.J.H., A.P. Johnstone, R. Thorpe, 1985:
Production and Assay of the Interleukins
J. Immunol. Meth. 83,1
- 45 Gedek, B., 1974:
Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen Futter-
mittelkontrolle
Dtsch. tierärztl. Wschr. 81,37u.65
- 46 Geftter, M., P. Marrack, 1986:
Immunology: Development and modification of the lympho-
cyte repertoire.
Nature 321,116
- 47 Ginsburg, H., T. Jehuda-Cohen, A. Kinarty, R. Coleman, S. Davidson,
Z. Lapidot 1986:
Does Stem Cell Self Renewal and Progenitor Cell Commitment
Operate Through an Effector-Memory Cell Mechanism?
Immunol. Letters 13,107
- 48 Goodman, J.W., G.S. Hodgson, 1962:
Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice
Blood 19(6),702
- 49 Grabstein, K.H., D.L. Urdal, R.J. Tushinski, D.Y. Mochizuki, V.L. Price,
M.A. Cantrell, S. Gillis, P.J. Conlon, 1986:
Induction of Macrophage Tumoricidal Activity by Granulo-
cyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Science 232,506
- 50 Hapel, A.J., J.M. Osborne, M.C. Fung, I.G. Young, W. Allan, D.A. Hume,
1985:
Expression of 20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Mouse
Macrophages, Hemopoietic Cells, and Cell Lines and its
Induction by Colony-Stimulating Factors
J. Immunol. 134(4),2492
- 51 Hayashi, S., T. Masuno, S. Hosoe, I. Kawase, M. Sakatani, T. Ogura,
S. Kishimoto, Y. Yamamura, 1986:
Augmented Production of Colony-Stimulating Factor in
C3H/HeN Mice Immunized with *Nocardia rubra* Cell Wall
Skeleton
Infect. Immun. 52(1),128
- 52 He, Y., E. Hewlett, G. Baber, E. McGrath, P.J. Quesenberry, 1986:
The Effect of Pertussis Toxin on Interleukin-3 and Colony
Stimulating Factor-1 Stimulated Cell Growth
Exp. Hematol. 14(6),547
- 53 Heck, R., H.J. Rziha, F. Weiland, H.J. Bühring, V.F. Ohlinger, 1986:
Untersuchungen zur in vivo und in vitro Infizierbarkeit von
Knochenmarkszellen mit Pseudorabies (Herpes suis 1) unter
experimentellen und natürlichen Infektionsbedingungen.
Tagung der Sektion Virologie der deutschen Gesellschaft für
Hygiene und Mikrobiologie, Freiburg

- 54 Helgestad,J., I.Storm-Mathisen, S.O.Lie, 1986:
Vitamin C and Thiol Reagents Promote the In Vitro Growth
of Murine Granulocyte/Macrophage Progenitor Cells by
Neutralizing Endogenous Inhibitor(s)
Blut 52,1
- 55 Hock,R.A., A.D.Miller, 1986:
Retrovirus mediated transfer and expression of drug re-
sistance genes in human haematopoietic progenitor cells.
Nature 320,275
- 56 Hültner,L., F.G.Staber, H.-G.Mergenthaler, P.Dörmer, 1982:
Production of Murine Granulocyte-Macrophage
Colony-Stimulating Factors (GM-CSF) by Bone Marrow
Derived and Non-Hemopoietic Cells In Vivo
Exp. Hematol. 10(9),798
- 57 Hültner,L.M., 1985:
Humorale Regulation der Hämatopoese - Produktion
hämatopoetischer Mediatoren in vitro und in vivo -
Vet. med. Diss., München
- 58 Humphries,R.K., P.B.Jacky, F.J.Dill, A.C.Eaves, 1979:
CFU-S in individual erythroid colonies derived in vitro
from adult mouse marrow
Nature 279,718
- 59 Ihle,J.N., J.Keller, L.Henderson, F.Klein, E.Palaszynski, 1982:
Procedures for the purification of interleukin 3 to
homogeneity
J. Immunol. 129,2431
- 60 Ihle,J.N., J.Keller, S.Oroszlan, L.E.Henderson,
T.D.Copeland, F.Fitch, M.P.Prystowsky, E.Goldwasser,
J.W.Schrader, E.Palaszynski, M.Dy, B.Lebel, 1983:
Biologic properties of homogenous interleukin 3:
Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast
cell growth factor activity, P-cell stimulating factor
activity, colony stimulating factor activity, and
histamin producing cell stimulating factor activity.
J. Immunol. 131,282
- 61 Ihle,J.N., L.Pepersack, L.Rebar, 1981:
Regulation of T-cell Differentiation: In Vitro Induction
of 20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Splenic
Lymphocytes from Athymic Mice by a Unique Lymphokine
J. Immunol. 126,2184
- 62 Johnson,G.R., D.C.Barker, 1985:
Erythroid Progenitor Cells and Stimulating Factors
during Murine Embryonic and Fetal Development
Exp. Hematol. 13,200
- 63 Joklik,W.K., 1962:
Purification of Pox Viruses
Virology 18,9

- 64 Kasahara,T., J.Y.Djeu, S.F.Dougherty, J.J.Oppenheim, 1983:
Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to
produce multiple lymphokines: interleukin 2, interferon,
and colony stimulating factor
J. Immunol. 131,2379
- 65 Keller,G., C.Paige, E.Gilboa, E.F.Wagner, 1985:
Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid
cells derived from multipotent haematopoietic precursors
Nature 318,149
- 66 Kelso,A., D.Metcalf, 1985:
Characteristics of Colony-Stimulating Factor Production
by murine T-Lymphocyte Clones
Exp. Hematol. 13(7),7
- 67 Koike,B.K., E.R.Stanley, J.N.Ihle, M.Ogawa, 1986:
Macrophage Colony Formation Supported by Purified CSF-1
and/or Interleukin 3 in Serum-Free Culture: Evidence for
Hierarchical Difference in Macrophage Colony-Forming
Cells
Blood 67(4),859
- 68 Kurland,J.I., H.E.Broxmeyer, L.M.Pelus, R.S.Bockman,
M.A.S.Moore, 1978:
Role for monocyte-macrophage derived colony stimulating
factor and prostaglandin E in the positive feedback
control of myeloid stem cell proliferation
Blood 52(2),388
- 69 Kurland,J.I., L.Pelus, P.Ralph, R.S.Bockman, M.A.S.Moore, 1979:
Induction of prostaglandin E synthesis in normal and
neoplastic macrophages: Role for colony-stimulating
factor(s) distinct from effects on myeloid progenitor
cell proliferation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(5),2326
- 70 Ladisch,S., G.H.Reaman, D.G.Poplack, 1979:
Bacillus Calmette-Guérin Enhancement of Colony-
Stimulating Activity and Myeloid Colony Formation
following Administration of Cyclophosphamide
Cancer Res. 39,2544
- 71 Latsinik,N., E.A.Luria, A.J.Friedenstein, N.L.Samoylina,
I.L.Chertkov, 1975:
Colony-Forming Cells in Organ Cultures of Embryonal Liver
J. Cell. Physiol. 75,163
- 72 LeBeau,M.M., C.A.Westbrook, M.O.Diaz, R.A.Larson,
J.D.Rowley, J.C.Gasson, D.W.Golde, C.J.Sherr, 1986:
Evidence for the Involvement of GM-CSF and FMS in the
Deletion (5q) in Myeloid Disorders
Science 231,984
- 73 Li,C.L., G.R.Johnson, 1985:
Stimulation of multipotential, erythroid and other
murine haematopoietic progenitor cells by adherent cell
lines in the absence of detectable multi-CSF
Nature 316,633

- 74 Lopez,A.F., C.G.Begley, D.G.Williamson, D.J.Warren,
M.A.Vadas, C.J.Sanderson, 1986:
Murine Eosinophil Differentiation Factor: An
Eosinophil-Specific Colony-Stimulating Factor with
Activity for Human Cells
J. Exp. Med. 163,1085
- 75 Luger,T.A., A.Köck, M.Danner, 1985:
Characterization of Immunoregulatory Cytokines Produced
by Epidermal Cells
Scand. J. Immunol. 21,455
- 76 Luger,T.A., U.Wirth, A.Köck, 1985:
Epidermal cells synthesize a cytokine with interleukin 3
like properties
J. Immunol. 134(2),915
- 76a Magnuson,N.S., A.Pollard, T.Yilma, R.Reeves, J.A.Magnuson,
1986:
Suppression of the Bovine Mitogenic Response by
Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus.
Proceedings of the First International Veterinary
Immunology Symposium, p.159
Guelph, Canada
- 77 Mayr,A., 1982:
Paramunität und Paramunisierung
Zbl. Vet. Med. B 29,5
- 78 Mayr,A., H.Raettig, H.Stickl, M.Alexander, 1979:
Paramunität, Paramunisierung, Paramunitätsinducer -
Teil I und II
Fortschr. Med. 97,1159u.1205
- 79 Mayr,A., M.Büttner, S.Pawlas, V.Erfle, B.Mayr, R.Brunner,
K.Osterkorn, 1986:
Vergleichende Untersuchungen über die
immunstimulierende (paramunisierende) Wirksamkeit von
BCG, Levamisol, Corynebacterium parvum und Präparaten
aus Pockenviren in verschiedenen "in vivo" und "in
vitro" - Testen
J. Vet. Med. B 33,321
- 80 Mayr,A., M.Herlyn, H.Mahnel, A.Danco, A.Zach, H.Bostedt,
1981:
Bekämpfung des Ecthyma contagiosum (Pustuladermatitis)
der Schafe mit einem neuen
Parenteral-Zellkultur-Lebendimpfstoff
Zbl. Vet. Med. B 28,535
- 81 McNeill,T.A., 1973:
Inhibition of Haemopoietic Colony Growth by Interferon
Preparations from Different Sources.
Nature New Biology 224,173
- 82 McNeill,T.A., 1973:
Release of Bone Marrow Colony Stimulating Activity
during Immunological Reactions In Vitro.
Nature New Biology 224,175

- 83 McNeill,T.A., 1975:
The Influence of Bone Marrow Colony-Stimulating Factor
on Immune Systems
Behring Inst. Mitt., 57,1
- 84 Metcalf,D., 1976:
Studies on Colony Formartion In Vitro by Mouse Bone
Marrow Cells
J. Cell. Physiol. 76,89
- 85 Metcalf,D., 1977:
Hemopoietic Colonies. In vitro cloning of normal and
leukemic cells.
Recent Results in Cancer Research 61, Springer, Berlin
- 86 Metcalf,D., 1985:
The Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors
Science 229,16
- 87 Metcalf,D., 1986:
The Molecular Biology and Functions of the
Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors
Blood 67(2),257
- 88 Metcalf,D., C.G.Begley, G.R.Johnson, 1986:
Hemopoietic Effects of Purified Bacterially Synthesized
Multi-CSF in Normal and Marrow-Transplanted Mice
Immunobiol. 172,158
- 89 Metcalf,D., J.Parker, H.M.Chester, P.W.Kincade, 1974:
Formation of eosinophilic-like granulocytic colonies by
mouse bone marrow cells in vitro
J. cell. Physiol. 84,275
- 90 Metcalf,D., M.A.S.Moore, N.L.Warner, 1969:
Colony Formation In Vitro by Myelomonocytic Leukemic
Cells
J. natn. Cancer Inst. 43,983
- 91 Metcalf,D., 1984:
The clonal culture of hemopoietic cells
Elsevier Science Publishers, Amsterdam
- 92 Miller,A.M., R.S.Weiner, V.A.Ziboh, 1986:
Evidence for the Role of Leukotrienes C4 and D4 as
Essential Intermediators in CSF-stimulated Human Myeloid
Colony Formation
Exp. Hematol. 14,760
- 93 Mintz,B., K.Anthony, S.Litwin, 1984:
Monoclonal derivation of mouse myeloid and lymphoid
lineages from totipotent hematopoietic stem cells
experimentally engrafted in fetal hosts
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81,7835
- 94 Mochizuki,D.Y., J.R.Eisenmann, P.J.Conlon, L.S.Park,
D.L.Urdal, 1986:
Development and Characterization of Antiserum to Murine
Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
J. Immunol. 136(10),3706

- 95 Moore,M.A.S., 1982:
G-CSF: Its Relationship to Leukemia Differentiation-
Inducing Activity and other Hemopoietic Regulators
J. cell. Physiol. Suppl. 1,53
- 96 Moore,M.A.S., D.Metcalf, 1970:
Ontogeny of the haemopoietic system: Yolk sac origin of
in vivo and in vitro colony forming cells in the
developing mouse embryo
Brit. J. Haematol. 18,279
- 97 Moore,R.N., B.T.Rouse, 1983:
Enhanced responsiveness of committed macrophage
precursors to macrophage-type colony-stimulating factor
(CSF-1) induced in vitro by interferon $\alpha + \beta$
J. Immunol. 131,2374
- 98 Moore,R.N., F.J.Pitruzzello, D.G.Deana, B.T.Rouse, 1985:
Endogenous Regulation of Macrophage Proliferation and
Differentiation by E Prostaglandins and Interferon α / β
Lymphokine Res. 4(1),43
- 99 Motoyoshi K., Y.Ishizaka, Y.Miura, F.Takaku, 1986:
Clinical Application of Partially Purified Human Urinary
Colony-Stimulating Factor
Immunobiol. 172,205
- 100 Munker,R., J.Gasson, M.Ogawa, H.P.Koeffler, 1986:
Recombinant human TNF induces production of
granulocyte-monocyte colony-stimulating factor
Nature 323,79
- 101 Murphy,M., R.Loudon, M.Kobayashi, G.Trinchieri, 1986:
gamma-Interferon and Lymphotoxin, Released by Activated
T Cells, Synergize to Inhibit Granulocyte/Monocyte
Colony Formation
J. Exp. Med. 164,263
- 102 Nagata,S., M.Tsuchiya, T.Yamasaki, O.Yamamoto, Y.Hirata,
N.Kubota, M.Oheda, H.Nomura, M.Ono, 1986:
Molecular cloning and expression of cDNA for human
granulocyte colony-stimulating factor
Nature 319,415
- 103 Nicola,N.A., A.W.Burgess, D.Metcalf, 1979:
Similar Molecular Properties of Granulocyte-Macrophage
Colony-Stimulating Factors Produced by Different Mouse
Organs In Vitro and In Vivo
J. Biol. Chem. 254(12),5290
- 104 Nicola,N.A., C.G.Begley, D.Metcalf, 1985:
Identification of the human analogue of a regulator that
induces differentiation in murine leukaemic cells
Nature 318,625

- 105 Nikcevich,D.A., M.R.Young, N.K.Ellis, M.Newby, H.T.Wepsic, 1986:
Stimulation of Hematopoiesis in Untreated and Cyclophosphamide Treated Mice by the Inhibition of Prostaglandin Synthesis
J. Immunopharmacology 8(3),299
- 106 Noma,Y., P.Sideras, S.Bergstedt-Lindquist, C.Azuma, E.Sverinson, T.Tanabe, T. Kinashi, F.Matsuda, Y.Yaoita, T.Honjo, 1986:
Cloning of cDNA encoding IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter.
Nature 319,640
- 107 O'Garra,A., D.J.Warren, M.Holman, A.M.Popham, C.J.Sanderson, G.G.B.Klaus, 1986:
Interlukin 4 (B-cell growth factor II/eosinophil differentiation factor) is a mitogen and differentiation factor for preactivated murine B lymphocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83,5228
- 108 Ohara,J., W.E.Paul 1985:
Production of a monoclonal antibody to and molecular characterization of B-cell stimulatory factor-1
Nature 315,333
- 109 Owhashi,M., Y.Nawa, 1986:
Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Produced by Splenic T Lymphocytes of Mice Infected with Schistosoma japonicum
Infect. Immun. 51(1),213
- 110 Parker,J.W., D.Metcalf, 1974:
Production of Colony-Stimulating Factor in Mitogen-Stimulated Lymphocyte Cultures
J. Immunol. 112(2),502
- 111 Platzer,E., S.Oez, K.Welte, A.Sendler, J.L.Gabrilove, R.Mertelsmann, M.A.S.Moore, J.R.Kalden, 1986:
Human Pluripotent Hemopoietic Colony Stimulating Factor: Activities on Human and Murine Cells
Immunobiol. 172,185
- 112 Quesenberry,P., A.Morley, F.Stohlman, K.Rickard, D.Howard, M.Smith, 1972:
Effect of endotoxin on granulopoiesis and colony-stimulating factor
N. Engl. J. Med. 286,227
- 113 Ralph P., M.K.Warren, I.Nakoinz, M.-T.Lee, L.Brindley, A.Sampson-Johannes, E.S.Kawasaki, M.B.Ladner, J.E.Strickler, A.Boosman, J.Csejtey, T.J.White, 1986:
Biological Properties and Molecular Biology of the Human Macrophage Growth Factor, CSF-1
Immunobiol. 172,194

- 114 Ralph,P., M.K.Warren, M.T.Lee, J.Csejtey, J.F.Weaver, H.E.Brox-meyer, D.E.Williams, E.R.Stanley, E.S.Kawasaki, 1986:
Inducible Production of Human Macrophage Growth Factor,
CSF-1
Blood 68(3),633
- 115 Reubel,G., 1984:
Gewinnung von Mediatoren aus Zellkulturen zur Stimulierung
der unspezifischen Infektabwehr
Vet. Med. Diss., München
- 116 Rossant,J., K.M.Vijh, C.E.Grossi, M.D.Cooper, 1986:
Clonal origin of haematopoietic colonies in the postnatal
mouse liver.
Nature 319,507
- 117 Sanderson,C.J., G.G.B.Klaus, 1986:
Interleukin terminology in disarray.
Nature 319,687
- 118 Scheven,B.A.A., J.W.M.Visser, P.J.Nijweide, 1986:
In vitro osteoclast generation from different bone
marrow fractions, including a highly enriched
haematopoietic stem cell population.
Nature 321,79
- 119 Schlick,E., K.Hartung, H.C.Stevenson, M.A.Chirigos, 1985:
Secretion of Colony-Stimulating Factors by Human
Monocytes and Bone Marrow Cells after In Vitro Treatment
With Biological Response Modifiers
J. Leukocyte Biol. 37,615
- 120 Schlick,E., K.Hartung, M.A.Chirigos, 1984:
Role of Prostaglandin E and Interferon in Secretion of
Colony-Stimulating Factor by murine Macrophages after In
Vitro Treatment with Biological Response Modifiers
Int. J. Immunopharmac. 6(5),407
- 121 Schlick,E., R.Ruffmann, K.Hartung, M.A.Chirigos, 1985:
Modulation of Myelopoiesis by CSF-Inducing Biological
Response Modifiers
J. Immunopharmacol. 7(1),141
- 122 Schlick,E., W.Ruscetti, 1986:
In Vivo Induction of Terminal Differentiation of
Malignant Myelopoietic Progenitor Cells by CSF-Inducing
Biological Response Modifiers
Blood 67(4),980
- 123 Schneider,E., J.N.Ihle, M.Dy, 1985:
Homogenous Interleukin 3 Enhances Arginase Activity in
Murine Hematopoietic Cells
Lymphokine Res. 4(2),95
- 124 Schrader,J.W., 1983:
Bone Marrow Differentiation In Vitro
Crit. Rev. Immunol. 4(3),197

- 125 Schrader, J.W., 1984:
Role of a Single Haemopoietic Growth Factor in Multiple Proliferative Disorders of Haemopoietic and Related Cells
Lancet, July 21, 133
- 126 Schrader, J.W., R.M. Crapper, 1983:
Autogenous production of a hemopoietic growth factor, persisting-cell-stimulating factor, as a mechanism for transformation of bone marrow-derived cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6892
- 127 Smith, C.A., D.M. Rennick, 1986:
Characterization of a murine lymphokine distinct from interleukin 2 and interleukin 3 (IL-3) possessing a T-cell growth factor activity and a mast-cell growth factor activity that synergizes with IL-3
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1857
- 128 Souza, L.M., T.C. Boone, J. Gabilove, P.H. Lai, K.M. Zsebo, D.C. Murdoch, V.R. Chazin, J. Brzuszewski, H. Lu, K.K. Chen, J. Barendt, E. Platzter, M.A.S. Moore, R. Mertelsmann, K. Welte, 1986:
Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor: Effects on Normal and Leukemic Myeloid Cells
Science 232, 61
- 129 Spooncer, E., B.I. Lord, T.M. Dexter, 1985:
Defective ability to self-renew in vitro of highly purified primitive haematopoietic cells
Nature 316, 62
- 130 Sporn, M.B., A.B. Roberts, 1985:
Autocrine growth factors and cancer
Nature 313, 745
- 131 Staber, F.G., 1979:
Differentiation of Hemopoietic Cells
Dissertation (Dr. phil.), University of Melbourne
- 132 Staber, F.G., L. Hültner, F. Marcucci, P.H. Krammer, 1982:
Production of colony-stimulating factors by murine T cells in limiting dilution long-term cultures
Nature 298, 79
- 133 Toretsky, J.A., N.T. Shahidi, J.L. Finlay, 1986:
Effects of Recombinant Human Interferon γ on Hematopoietic Progenitor Cell Growth
Exp. Hematol. 14, 182
- 134 Trinchieri, G., B. Perussia, 1985:
Immune Interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects
Immunol. Today 6(4), 131
- 135 Tussenok, K., M. Shikita, 1984:
A Granulocyte Colony Stimulating Factor from Serum-Free Cultures of RSP-2-P3 Cells: Its Separation from a Macrophage Colony-Stimulating Factor and its Biological and Molecular Characterization
Cell Structure and Function 9, 67

- 136 Urabe,A., K.Akahane, T.Hosoi, M.Kawakami, F.Takaku, 1986:
Inhibitory Effects of Recombinant Human Tumor Necrosis
Factor on Normal Human and Murine Hemopoietic Progenitors
Exp. Hematol. 14(6),556
- 137 Vadas,M.A., F.A.Lopez, 1984:
Regulation of Granulocyte Function by Colony Stimulating
Factors
Lymphokine Res. 3(2),45
- 138 Vadas,M.A., N.A.Nicola, D.Metcalf, 1983:
Activation of antibody dependent cell-mediated
cytotoxicity of human neutrophils and eosinophils by
separate colony-stimulating factors
J. Immunol. 130(2),795
- 139 VanFurth,R., 1986:
Overview: the mononuclear phagocyte system. In: Handbook
of Experimental Immunology - 4th ed., Vol.2 ed. by
L.A.Herzenberg
Blackwell Scientific Publications, London
- 140 Warren,D.J., C.J.Sanderson, 1985:
Production of a T-cell hybrid producing a lymphokine
stimulating eosinophil differentiation
Immunology 54,615
- 141 Warren,M.K., S.N.Vogel, 1985:
Bone marrow derived macrophages: Development and
regulation of differentiation markers by colony
stimulating factor and interferons
J. Immunol. 134,982
- 142 Watson,J.D., R.L.Prestidge, 1983:
Interleukin 3 and colony-stimulating factors
Immunol. Today 4(10),278
- 143 Weisbart,R.H., D.W.Golde, S.C.Clark, G.G.Wong, J.C.Gasson,
1985:
Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
is a neutrophil activator
Nature 214,361
- 144 Welte,K., E.Platzer, L.Lu, J.L.Gabrilove, E.Levi,
R.Mertelsmann, M.A.S.Moore, 1985:
Purification and biochemical characterization of human
pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,1526
- 145 Wing,E.J., L.C.Barczynsky, A.Waheed, R.Shadduck, 1985:
Effect of *Listeria monocytogenes* Infection on Serum
Levels of Colony-Stimulating Factor and Number of
Progenitor Cells in Immune and Nonimmune Mice
Infect. Immun. 49(2),325

- 146 Wong,G.G., J.S.Witek, P.A.Temple, K.M.Wilkens, A.C.Leary, D.P.Luxenberg, S.S.Jones, E.L.Brown, R.M.Kay, E.C.Orr, C.Shoemaker, D.W.Golde, R.J.Kaufman, R.M.Hewick, E.A.Wang, S.C.Clark, 1985:
Human GM-CSF: Molecular Cloning of the Complementary DN and Purification of Natural and Recombinant Proteins
Science 228,810
- 147 Wu,M.C., P.M.Reuben, 1984:
Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor from Cultured Normal Rat Kidney Cell Line
Exp. Hematol. 12,267
- 148 Yarden,Y., J.A.Escobedo, W-J.Kuang, T.L.Yang-Feng, T.O.Daniel, P.M.Tremle, E.Y.Chen, M.E.Ando, R.N.Harkins, U.Francke, V.A.Fried, A.Ullrich, L.T.Willams, 1986:
Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors
Nature 323,226
- 149 Ymer,S., W.Q.J.Tucker, C.J.Sanderson, A.J.Hapel, H.D.Campbell, I.G.Young, 1985:
Constitutive synthesis of interleukin-3 by leukemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near the gene
Nature 317,255
- 150 Yokokura,T., Ko.Nomoto, T.Shimizu, Ki.Nomoto, 1986:
Enhancement of Haematopoietic Response of Mice by Subcutaneous Administration of Lactobacillus casei
Infect. Immun. 52(1),156
- 151 Young,A.M., C.Cheers, 1986:
Colony-Forming Cells and Colony-Stimulating Activity during Listeriosis in Genetically Resistant or Susceptible Mice
Cell. Immun. 97,227
- 152 Yung,Y.P., M.A.S.Moore, 1982:
Long-Term In Vitro Culture of Murine Mast Cells:
III. Discrimination of Mast Cell Growth Factor and Granulocyte-CSF
J. Immunol. 129,1256
- 153 Yunis,A.A., J.J.Jimenez, Ming-chi Wu, P.E.Andreotti, 1984:
Further Evidence Supporting an In Vivo Role for Colony-Stimulating Factor
Exp. Hematol. 12,838
- 154 Zsebo,K.M., A.M.Cohen, D.C.Murdock, T.C.Boone, H.Inoue, V.R.Chazin, D.Hines, L.M.Souza, 1986:
Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor: Molecular and Biological Characterization
Immunobiol. 172,175

7. Abkürzungen

ADCC	Antibody-Dependent Cytotoxicity
BCG	Bacillus Calmette Guérin
BCGF	B-Cell Growth Factor
BEL	bovine embryonale Lunge
BK	bovine Niere (Bovine Kidney)
CFC	Colony Forming Cell
CFU-S	Colony Forming Unit in the Spleen (Stammzelle)
ConA	Concanavalin A
CSA	kolonienstimulierende Aktivität (Colony Stimulating Activity)
CSF	kolonienstimulierender Faktor (Colony-Stimulating Factor)
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
DMEM	Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
EDF	Eosinophil Differentiation Factor
Eo-	eosinophile Granulozyten
ETAF	Thymozyten-aktivierender Faktor aus epidermalen Zellen (Keratinocyten)
FCS	fetales Kälberserum
G-	neutrophile Granulozyten
GM-	neutrophile Granulozyten und Makrophagen
GVH	Graft Versus Host Reaction
H2	Histokompatibilitäts Antigen
HCGF	histamin-producing cell growth factor
hu-	human
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
LD	Dosis letalis
LPS	Lipopolysaccharid (aus Salmonella typhimurium)
M-	Makrophagen
Mast-	Mastzellen

MGI	Makrophagen-Granulozyten Induktor
MLC	Mixed Lymphocyte Culture
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
mu-	murin
MVE	Monovinylether
NC	Natural Cytotoxic Cell
NCTC	Natural Cytotoxic T-Cell
NK	Natural Killer Cell
PHA	Phythämagglutinin
PIND	Paramunitätsinducer
PMA	Phorbol Myristat Acetat
PSF	P-Cell Stimulating Factor
PWM	Pokeweed Mitogen
SCM	Milzzellenkonditioniertes Medium (Spleen Cell Conditioned Medium)
TCGF	T-Cell Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
VSV	Stomatitis vesicularis Virus

Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr, der die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte und stets unterstützte, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Besonders danke ich Herrn Dr. Mathias Büttner für seine wertvollen Anregungen und seine freundschaftliche Unterstützung.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Labors und des gesamten Institutes für die kollegiale Zusammenarbeit.

LEBENS LAUF

- 1958 geboren am 6. Oktober in Edersberg, Eltern: Katharina Wolf, geb. Lachner, und Josef Wolf
- 1965 Volksschule Scheyern
- 1969 Schyregymnasium Pfaffenhofen/Scheyern, humanistischer Zweig
- 1978 Abitur (reformierte Oberstufe)
- Grundwehrdienst
- 1979 Studium der Tiermedizin in München
- 1985 Approbation als Tierarzt
- Beginn der Doktorarbeit

